



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PISA
Corso di Laurea Magistrale in Medicina Veterinaria

Titolo della tesi:
“NEONATOLOGIA EQUINA:
STUDIO DELL’ASSE IPOFISI-SURRENE”

Candidato:
Valentina Paci

Relatore:
Prof. Michele Corazza

Correlatore:
Dott. ssa Micaela Sgorbini

RIASSUNTO

Parole chiave: cortisolo, ACTH, asse ipofisi-surrene, maturità, prematurità, dismaturità

L'attivazione dell'asse endocrino ipofisi-surrenale nel feto equino avviene solo in prossimità del parto. Ciò è stato messo in correlazione con una possibile compromissione della sopravvivenza neonatale del puledro quando l'attività surrenale nelle prime ore di vita non è sufficiente.

In questa ricerca è stato approfondito lo studio dell'andamento della concentrazione ematica di ACTH e cortisolo nelle prime 48h di vita del puledro; questa valutazione è stata corredata da rilievi clinici e da altri parametri che potessero essere di ausilio nel determinare il livello di maturità alla nascita. La ricerca è stata condotta su puledri trottatori, tra Aprile e Giugno, nell'arco di due stagioni riproduttive. I campioni ematici di ACTH e cortisolo sono stati raccolti in tre sessioni: T1 (0-6h); T2 (24h); T3 (48h), attraverso il prelievo dalla vena giugulare. Come ausilio per la determinazione del livello di maturità alla nascita sono stati raccolti anche dati anamnestici sulla fattrice e dati sul puledro (APGAR, visita clinica, glicemia, trasferimento dell'immunità passiva...). I risultati nei soggetti apparentemente sani evidenziano un andamento simile a quello riportato in letteratura: concentrazioni decrescenti sia di ACTH che di cortisolo da T1 a T3; nei soggetti con scarsa vitalità alla nascita sono invece stati messi in evidenza livelli decrescenti di ACTH e cortisolo da T1 a T2, ma nuovamente crescenti a T3, confermando la stretta interdipendenza funzionale nel loro meccanismo di secrezione (feedback -). Tuttavia l'ampia variabilità del tasso plasmatico medio di ACTH e cortisolo riscontrato in T1 conferma la necessità di effettuare, nelle prime ore di vita, prelievi più serrati nel tempo per poter descrivere in modo più dettagliato tale andamento.

ABSTRACT

Key-words: cortisol, ACTH, pituitary-adrenal axis, maturity, prematurity, dismaturity

In the equine fetus the activation of the pituitary-adrenal axis begins only a few hours before birth. This event is compared with the survival of the foals.

In this research the trend of the plasmatic concentration of ACTH and cortisol was studied in foals during their first 48 hours lifetime; this study was supplemented with clinical assessments and other parameters which are able to explain the maturity level of foals at birth. A group of a trotter foals was studied during two reproductive season, between april and june. The blood samples of ACTH and cortisol were taken in three different moments from the jugular vein: T1 samples (from 0 to 6 h lifetime); T2 samples (at 24h lifetime); T3 samples (at 48h lifetime). Mare anamnestic datas and other foal's assessments (APGAR, clinic examination, glycemia, the tranfer of passive immunity to the foal,...) were used to determine the maturity level at birth. The results have a trend similar to that quoted in literature: decreasing values of ACTH and cortisol concentrations between T1 and T3 samples in healthy foals; in poor viable subjects ACTH and cortisol concentrations between T1 and T2 samples decreased , but increased between T2 and T3; this trend confirms that the ACTH and cortisol secretory mechanisms are closely connected themselves by a negative feedback system. The large variability in the values of the ACTH and cortisol concentration in T1 shows the necessity to take this blood samples in a strict period of time, in this way will be possible to give a better description of their trend.

INDICE

PARTE GENERALE.....	5
1.ANATOMIA E FISIOLOGIA DELLA ghiandola surrenale del cavallo.....	5
1.1. La corticale del surrene.....	6
1.2. La midollare del surrene	9
1.3. Steroidogenesi.....	9
2.ORMONI SURRENALICI: EFFETTI E SISTEMI DI REGOLAZIONE.....	11
2.1. Glicocorticoidi	11
2.1.1. Effetti metabolici	11
2.1.2. Effetti sul sistema cardio-vascolare	12
2.1.3. Effetti sul metabolismo minerale e sull'attività renale	13
2.1.4. Effetti sul sistema immunitario.....	13
2.2. ACTH (ormone adrenocorticotropo)	14
2.2.1. Regolazione della secrezione dei glicocorticoidi: asse ipotalamo-ipofisi-surrene	15
2.3. Mineralcorticoidi	18
2.3.1. Regolazione della secrezione di aldosterone	19
2.4. Catecolamine	20
2.4.1. Regolazione della secrezione delle catecolamine midollari	21
2.5. Disfunzioni della corteccia surrenalica nel cavallo	23
2.5.1. Iperadrenocorticismo	23
2.5.2. Ipoadrenocorticismo	24
2.6. Asse ipotalamo-ipofisi-surrene nel feto equino	25
2.6.1. Ruolo dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene nel feto equino	25
2.6.2. Il surrene nel feto equino (<i>Fowden and Silver, 1995</i>)	26
2.6.3. Steroidogenesi.....	27
2.6.4. Meccanismi di regolazione della corticale del surrene	28
2.6.5. Sviluppo dell'ipofisi fetale.....	30
2.6.6. Regolazione della secrezione di ACTH.....	31
3.GLI ORMONI DELLA TARDA GRAVIDANZA NELLA CAVALLA:.....	32
3.1. Ormoni che promuovono l'attività contrattile del miometrio.....	33
3.1.1. Ossitocina e Prostaglandine	33
3.1.2. Estrogeni	35
3.2. Ormoni che regolano la quiescenza dell'utero	37
3.2.1. Relaxina	37
3.2.2. Progesterone e progestageni	37
3.3. Rapporto tra attività corticosurrenalica fetale e meccanismi di regolazione del parto.	41
4.RUOLO DEI GLICOCORTICOIDI NELLA MATURAZIONE DI ALCUNI SISTEMI ORGANICI.....	43
4.1. Polmone	44
4.2. Fegato.....	45
4.3. Apparato gastroenterico	45

4.4. Pressione ematica e frequenza cardiaca: correlazione tra cortisolo e sist. renina-angiotensina	46
5.ADATTAMENTO ALLA VITA E SUO RUOLO COME EVENTO STRESSOGENO	48
5.1. Adattamento alla vita extra-uterina.....	48
5.1.1. Adattamento respiratorio	49
5.1.2. Adattamento cardiocircolatorio	50
5.1.3. Termoregolazione	51
5.1.4. Locomozione	52
5.1.5. Funzione nervosa	53
5.1.6. Adattamento gastroenterico	54
5.1.7. Funzione renale.....	55
5.1.8. Concentrazione ematica di glucosio	55
5.1.9. Asse ipofisi-surrene	56
5.1.10. Catecolamine	57
5.1.11. Funzione tiroidea	57
6.CONCETTO DI PREMATURITA’/DISMATURITA’	59
6.1. Definizioni	61
6.2. Segni clinici	62
6.3. Valutazioni di Laboratorio.....	64
6.4. Alcune cause di parto prematuro	66
6.5. Sindromi più frequenti nei puledri prematuri/dismaturi	69
6.5.1. Sindrome da maladattamento neonatale (NMS) - Asfissia perinatale (PAS) - Encefalopatia ipossi-ischemica (HIE)	69
6.5.2. Sindrome da distress respiratorio neonatale (NRDS) o malattia delle membrane ialine.....	73
PARTE SPERIMENTALE.....	76
7.SCOPO DELLA TESI.....	76
8.MATERIALI E METODI	77
8.1. Dati raccolti sulle fattrici	77
8.2. Dati raccolti sui puledri.....	78
8.3. Esame macroscopico degli invogli fetali:.....	81
8.4. Prelievi di routine.....	81
8.5. Protocollo sperimentale	82
8.6. Analisi statistica.....	83
9.RISULTATI.....	85
9.1. Gruppo 1 (SANI)	90
9.2. Gruppo 2	94
9.3. Gruppo 3 (BORDER-LINE).....	96
10.DISCOSSIONE E CONCLUSIONI.....	100
11.BIBLIOGRAFIA	105
12.RINGRAZIAMENTI.....	119

PARTE GENERALE

1. ANATOMIA E FISIOLOGIA DELLA GHIANDOLA SURRENALE DEL CAVALLO

Le surreni o ghiandole surrenali sono organi parenchimatosi pari, irregolarmente piramidali situati in posizione retroperitoneale. Le surreni del cavallo sono in rapporto con la porzione cranio-mediale di ciascun rene ed inglobati in abbondante tessuto adiposo. Il surrene destro ha la forma di una grossa virgola (lunghezza: 6-8cm; larghezza: 3cm; spessore: 1,5cm) ed è posto, tra vena cava caudale e muscolo psoas, in posizione leggermente più craniale rispetto al controlaterale; il sinistro ha dimensioni analoghe, ma è un po' più breve ed arrotondato caudalmente; contrae rapporti, cranialmente, con l'arteria mesenterica craniale e dorsolateralmente con l'arteria renale sinistra, l'aorta e il rene sinistro.

L'organo è costantemente irrorato da un ampio volume di sangue attraverso le arterie surrenaliche che si sfioccano a livello della capsula ghiandolare in arteriole brevi e lunghe che danno origine a capillari sinusoidi da cui ripartono venule e quindi vene surrenaliche.

L'innervazione è rappresentata quasi esclusivamente da nervi simpatici che formano terminali sinaptici a livello delle cellule cromaffini midollari, mentre scarsa è l'innervazione della corticale; sono inoltre presenti alcune fibre parasimpatiche il cui ruolo fisiologico è ancora oggetto di dibattito.

In tutti i mammiferi ciascuna ghiandola è suddivisa in due porzioni: *corticale* e *midollare*. La corticale deriva da tessuto mesodermico situato tra il mesentere intestinale dorsale e la superficie mediale del rene ed ha una

funzione steroidogenetica; la midollare origina dalla migrazione di cellule neuro-ectodermiche dai gangli primitivi del plesso celiaco ed è deputata alla secrezione di catecolamine (adrenalina e noradrenalina) in risposta alla stimolazione simpatica e come tale può essere considerata un'estensione del S.N.Simpatico.

Corticosteroidi e catecolamine sono ormoni implicati in numerosi processi metabolici coinvolti nell'adattamento alle mutevoli condizioni endogene ed esogene.

1.1.La corticale del surrene

Rappresenta l'80-90% del volume dell'organo ed è costituita da una capsula fibrosa esterna e dal parenchima suddiviso istologicamente in tre strati di cellule, corticociti, a funzione steroidogenetica: *zona glomerulosa*, *zona fasciculata*, *zona reticolare*. Queste zone sono deputate rispettivamente alla secrezione di: ormoni mineralcorticoidi (aldosterone); glicocorticoidi (cortisolo, corticosterone, cortisone e desossicorticosterone); steroidi sessuali (androgeni, estrogeni)

La *zona glomerulosa* ha uno spessore limitato con cellule disposte a semicerchio (da qui la denominazione alternativa di *z.arciata*) frammiste a vasi; la *zona fasciculata* rappresenta i due terzi dello spessore corticale con cordoni radiali di cellule cuboidi e poliedriche disposte in colonne perpendicolari alla capsula e frammiste a numerosi capillari sinusoidi; la *zona reticolare* è costituita da piccole cellule poliedriche disposte a rete frammiste ai sinusoidi.

In realtà tutte le cellule della corticale originano dalla zona glomerulosa più esterna e migrano verso quella reticolare più interna acquisendo progressivamente le caratteristiche funzionali specifiche, come la

differenziazione del pool enzimatico, per la sintesi e la liberazione degli ormoni corrispondenti; giunte alla zona reticolare le cellule vanno incontro a degenerazione per essere sostituite progressivamente dai nuovi strati in differenziazione.

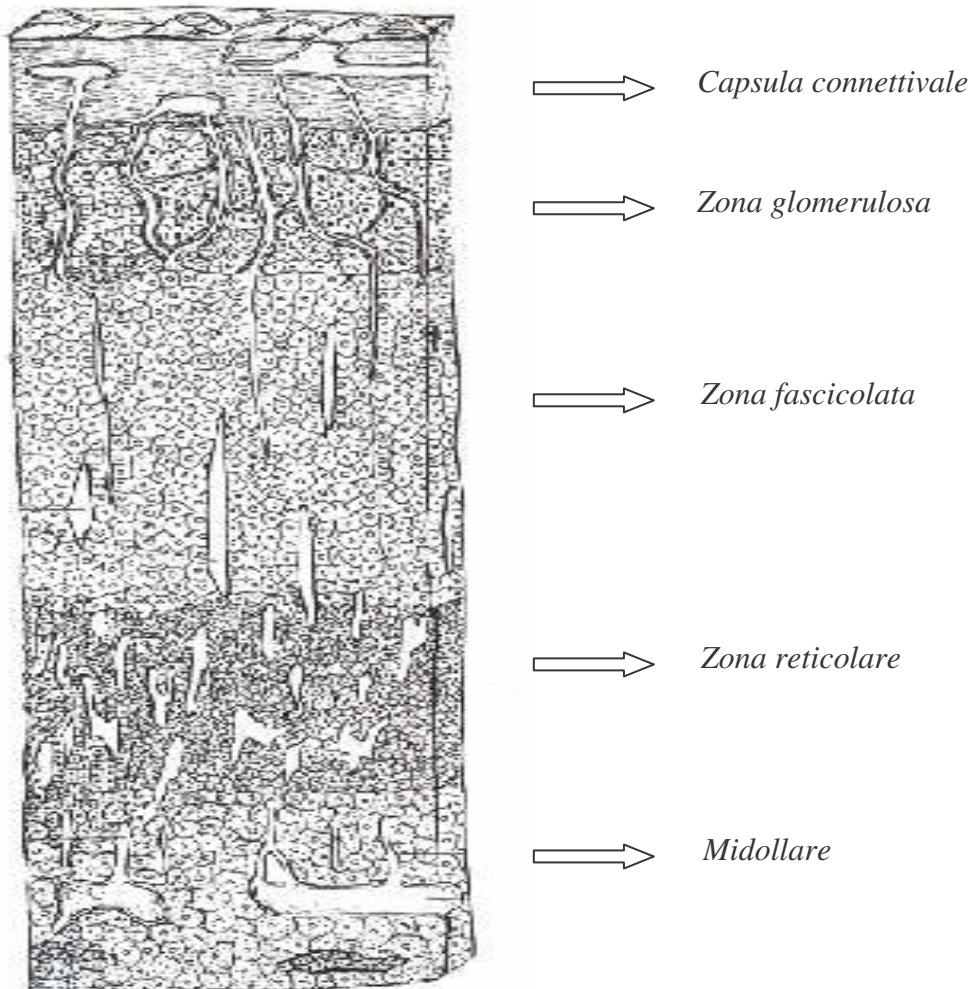


Fig.1: Struttura del surrene.

Dal punto di vista citologico le cellule presentano: citoplasma ricco di gocce lipidiche, abbondante reticolo endoplasmatico liscio, scarso reticolo endoplasmatico rugoso, un ampio complesso di Golgi e numerosi mitocondri. L'abbondanza di organelli citoplasmatici e di gocce lipidiche che contengono soprattutto colesterolo, precursore comune di tutti gli ormoni steroidei,

rappresenta probabilmente l'adattamento funzionale all'incapacità di immagazzinamento degli ormoni come tali, in modo da poter promuovere una rapida mobilitazione del precursore e successiva sintesi ormonale in risposta a richieste organiche improvvise.

Rispetto ad altre ghiandole la corteccia surrenale è soggetta ad un rapido turnover cellulare e quindi il mantenimento della funzionalità d'organo è legato ad un delicato equilibrio fra l'attività mitotica e l'apoptosi geneticamente programmata; qualsiasi variazione di tale equilibrio in qualità di sotto o sovra stimolazione comporta rispettivamente una riduzione o un aumento di spessore e dimensione della corteccia, in particolare a carico della zona fascicolata e reticolare.

Durante lo sviluppo fetale del puledro con il progredire della gravidanza sono distinguibili istologicamente due tipi cellulari nella zona fascicolata (*Webb and Steven, 1981; Webb, Leadon, Rosedale, Jeffcott, 1984*).

Il primo tipo è presente per la maggior parte della gestazione ed è rappresentato da cellule che contengono mitocondri a creste lamellari; il secondo tipo è costituito da cellule giganti situate in prossimità del margine cortico-midollare che contengono mitocondri a creste vescicolari, abbondante SER e ampio complesso del Golgi; lo spessore ed il peso della zona fascicolata sono quindi variabili in relazione allo stadio di maturità fetale, cioè alla prevalenza dell'uno o dell'altro tipo cellulare.

In altre specie animali è stato visto che le variazioni morfologiche della zona fascicolata avvengono in rapporto ad un'incrementata attività steroidogenetica (*Nussdorfer, Mazzocchi, Meneghelli, 1978*); un incremento dei livelli di cortisolo in concomitanza all'ipertrofia ed iperplasia delle cellule della zona fascicolata è stato dimostrato nella pecora negli ultimi giorni che precedono il parto (*Webb, 1980*).

1.2.La midollare del surrene

Il tessuto midollare presenta macroscopicamente un colorito rossastro per la ricca vascolarizzazione presente. Le cellule sono raccolte in addensamenti intorno ai capillari e, colorandosi selettivamente in bruno in presenza di cromo, sono definite appunto cellule cromaffini; lo stesso tipo di cellule è riscontrabile anche in sedi diverse (biforcazione dei grossi vasi) andando a costituire insieme a quelle surrenaliche il sistema cromaffine. Come i neuroni post-gangliari da cui derivano, le cellule cromaffini secernono catecolamine ma riversano il loro contenuto direttamente nel sangue poiché non possiedono prolungamenti assonici periferici. Sono innervate da fibre pre-gangliari colinergiche che provengono dal nucleo reticolare del midollo allungato, dal ponte e dai centri ipotalamici.

La midollare sintetizza e secerne principalmente adrenalina, noradrenalina e piccole quantità di dopamina.

1.3.Steroidogenesi

Gli ormoni steroidei vengono tutti prodotti a partire dal colesterolo.

Il colesterolo utilizzato dai corticociti è prevalentemente quello assorbito attraverso il tratto gastroenterico e da qui, poiché non idrosolubile, trasportato nel sangue da LDL (lipoproteine a bassa densità); tuttavia anche le cellule corticali sono in grado di sintetizzarlo a partire dall'acetato, per stimolazione diretta dell'ACTH.

La prima modificazione cui va incontro è la perdita di una porzione laterale della catena molecolare, trasformandosi in pregnenolone da cui derivano, attraverso vie enzimatiche diverse: progesterone, glicocorticoidi, mineralcorticoidi, androgeni ed estrogeni.

Gli ormoni steroidei una volta sintetizzati vengono subito messi in circolo poiché non sono previsti sistemi di immagazzinaggio intracellulare; questi ormoni transitano nel sangue veicolati da proteine di trasporto: albumina, transcortina e altre globuline ad affinità specifica, come l'SHBG (Sex Hormone Binding Protein) per gli steroidi sessuali; in particolare i glicocorticoidi circolano per il 90% legati alla transcortina (CBG, Corticosteroid Binding Protein) e per il restante 10% in forma libera e solo il progesterone ad elevate concentrazioni può competere con il cortisolo per i siti di legame (*Aguggini*).

Solamente gli ormoni liberi sono in grado di diffondere nelle cellule bersaglio e ciò costituisce un sistema di controllo della concentrazione ematica degli ormoni attivi limitandola a quelli effettivamente necessari; per esempio in gravidanza l'aumento della transcortina circolante può tamponare gli eventuali effetti di eccessive concentrazioni di cortisolo. Tuttavia nel cavallo, dove la concentrazione plasmatica di CBG è relativamente bassa, anche piccoli incrementi del tasso ematico di cortisolo totale determinano un incremento notevole della sua attività biologica in forma libera (*Seal and Doe, 1965; van der Kolk et al. 2001*).

Gli ormoni steroidei esplicano il loro effetto attraverso il legame con recettori specifici presenti nelle cellule bersaglio e, una volta esplicata la loro azione, vengono degradati a livello epatico o renale. Durante la degradazione, i corticosteroidi subiscono vari processi di riduzione, ossidazione ed idrossilazione prima di essere coniugati con acido glicuronico o solfati; i metaboliti coniugati, resi in tal modo idrosolubili, vengono infine escreti per un 75% con le urine e per il 25% con la bile.

2. ORMONI SURRENALICI: EFFETTI E SISTEMI DI REGOLAZIONE

2.1. Glicocorticoidi

I principali ormoni appartenenti a questa classe sono: cortisolo, cortisone, corticosterone e desossicorticosterone (DOC).

Sono sintetizzati e liberati dai corticociti della zona fascicolata e reticolare in proporzioni diverse a seconda della specie; nei mammiferi domestici così come nell'uomo l'ormone predominante è il cortisolo.

Gli effetti di questi ormoni sono molteplici e si ripercuotono su tutti i tessuti il cui metabolismo venga coinvolto dalla loro azione.

2.1.1. Effetti metabolici

- **Metabolismo dei carboidrati:** proteggono l'organismo dall'eventuale ipoglicemia post-prandiale o conseguente all'aumento di richieste energetico- metaboliche legate allo stress.

Il cortisolo ha infatti un effetto iperglicemizzante che esplica, direttamente, stimolando la gluconeogenesi e la glicogenolisi ma inibendo gli effetti dell'insulina la cui concentrazione tenderebbe ad aumentare in risposta all'iperglicemia, ed indirettamente potenziando l'attività del glucagone e dell'epinefrina verso cui esercita un'azione cosiddetta *permissiva*.

- **Metabolismo proteico:** promuovono il catabolismo proteico in tutti i tessuti eccetto il fegato dove invece stimolano la captazione degli aminoacidi e la sintesi delle proteine; a livello epatico l'aumentata disponibilità di aminoacidi stimola ulteriormente la gluconeogenesi

contribuendo all'effetto iperglicemizzante e promuove la sintesi di transaminasi e degli altri enzimi coinvolti nel ciclo dell'urea in modo da facilitare l'eliminazione renale dell'azoto proteico in eccesso.

L'azione proteolitica è particolarmente evidente a carico del tessuto muscolare, epiteliale, connettivale ed osseo.

- **Metabolismo lipidico:** sono deboli agenti lipolitici diretti che mobilitano gli acidi grassi dagli adipociti e ne inibiscono la captazione e la trasformazione in lipidi; hanno inoltre un'azione permissiva indiretta verso altri fattori lipolitici ormonali: glucagone, adrenalina e ormone della crescita (GH).

I glicocorticoidi favoriscono quindi una caratteristica ridistribuzione dei grassi di deposito nell'organismo con incremento della lipemia in tutte le sue componenti: trigliceridi, acidi grassi liberi, glicerolo, colesterolo.

Ciò permette all'organismo di poter usufruire di un'elevata riserva energetica cellulare cui poter attingere in caso di digiuno o stress prolungato.

2.1.2. Effetti sul sistema cardio-vascolare

I glicocorticoidi contribuiscono al mantenimento del normale tono vascolare e alla regolazione della pressione sanguigna attraverso l'azione permissiva verso: catecolamine, angiotensina e vasopressina (ADH).

Incrementano l'attività della pompa $\text{Na}^+\text{-K}^+$ a livello cardiaco con conseguente effetto inotropo e cronotropo positivo.

L'azione sinergica tra glicocorticoidi e catecolamine è particolarmente evidente quando concentrazioni insufficienti di cortisolo non consentono un'adequata liberazione di adrenalina e noradrenalina dai terminali simpatici o dalla midollare del surrene (azione antishock dei glicocorticoidi). Per

esempio, nel caso di soggetti con insufficienza surrenalica, gravi stress non sono accompagnati da una risposta noradrenergica vasocostrittoria sufficiente e ciò può comportare il collasso circolatorio del soggetto.

2.1.3. Effetti sul metabolismo minerale e sull'attività renale

Cortisolo e corticosterone possiedono una debole attività mineralcorticoide dovuta alla loro capacità di legame ai corrispettivi recettori a livello renale, ma contrariamente all'aldosterone stimolano la diuresi incrementando il volume di filtrazione glomerulare e antagonizzando l'azione renale dell'ADH. In condizioni fisiologiche tale attività ha una scarsa rilevanza, tuttavia già a dosi farmacologiche i glicocorticoidi possono interferire con il metabolismo minerale, causando ritenzione di sodio, ipokaliemia e tendenza all'alcalosi. Inoltre elevate concentrazioni ematiche inducono un'inibizione del rilascio di CRH e vasopressina, con conseguente aumento della clearance dell'acqua che si manifesta clinicamente con poliuria e polidipsia compensatoria.

2.1.4. Effetti sul sistema immunitario

- Effetto antinfiammatorio ed immunosoppressivo;
- riduzione della quota circolante di: eosinofili, basofili, monociti e linfociti;
- aumento di: globuli rossi, piastrine e neutrofili. La neutrofilia in particolare deriva da un incremento del numero di cellule che entrano nel circolo ematico, dalla diminuita rimozione della quota circolante e dall'inibita diapedesi leucocitaria verso il tessuto sede dell'infiammazione;
- riduzione della capacità fagica dei macrofagi, della produzione di anticorpi e citochine e della risposta cellulo- mediata;
- riduzione delle manifestazioni della flogosi per: diminuzione della permeabilità capillare, azione vasocostrittiva (azione permissiva sulle

catecolamine) ed inibizione della degranulazione dei basofili e della relativa secrezione di istamina.

2.2.ACTH (ormone adrenocorticotropo)

L'ACTH è un ormone peptidico a catena lineare prodotto, insieme ad altri peptidi ad azione ormonale, a partire da un precursore comune: la proopiomelanocortina (POMC). Questa molecola viene sintetizzata dalle cellule basofile della pars distalis dell'ipofisi, sebbene anche la pars intermedia possa produrne una certa quantità soprattutto nel cavallo e nel cane.

A partire dal POMC le cellule corticotrope sintetizzano: N- peptide terminale a catena lunga, ACTH e β -lipotropina. In particolare l'N-peptide terminale a catena lunga risulta inattivo in questa forma e necessita di un accorciamento della catena molecolare per svolgere la sua intensa attività di promozione della proliferazione delle cellule corticotrope.

Una volta sintetizzati, i derivati della POMC vengono immagazzinati in granuli nelle cellule ipofisarie e rilasciati in seguito a stimolazioni organiche specifiche; ogni stimolo che inibisca o favorisca il rilascio di ACTH induce parallelamente un effetto analogo sulla secrezione degli altri derivati.

Il fatto che i derivati della POMC siano prodotti dalla pars distalis o dalla pars intermedia assume un significato clinico importante, poiché i sistemi di regolazione della secrezione di tali molecole sono diversi; la pars distalis è sotto il controllo positivo del CRH (corticotropin releasing hormone) e dell'ADH (vasopressina) ipotalamici, mentre la pars intermedia è sotto controllo inibitorio della dopamina (*Dybdal et al. 1994; Dybdal, 1997; Bruyette et al. 1997*).

Il CRH, liberato a livello ipotalamico in risposta a vari stimoli stressogeni, si lega alle cellule ipofisarie determinando un incremento della concentrazione di cAMP intracellulare che promuove il rilascio di ACTH e la sintesi di nuovo POMC; ciò a sua volta, attraverso un meccanismo di feedback positivo a lungo raggio, attivato dal legame tra ACTH e corticociti della zona fascicolata e reticolare, stimola la secrezione di cortisolo e corticosterone surrenalici. L'ACTH regola inoltre, con un meccanismo di feedback negativo a corto raggio, la secrezione ipotalamica del CRH.

2.2.1. Regolazione della secrezione dei glicocorticoidi: asse ipotalamo-ipofisi-surrene

I livelli basali di glicocorticoidi sottostanno al controllo esercitato dal sistema nervoso attraverso l'asse ipotalamo-ipofisario ed in particolare al meccanismo di feed-back negativo esercitato a più livelli dalla concentrazione ematica di CRH ipotalamico, ACTH ipofisario e cortisolo surrenalico. Molte specie mostrano inoltre un ritmo circadiano nella liberazione di tali ormoni; in particolare nel cavallo è stato messo in evidenza un ritmo secretorio diurno di cortisolo con concentrazioni massime al mattino (*Hoffsis et al. 1970; James et al. 1970; Bottoms et al. 1972; Kumar et al. 1976; Larsson et al. 1979; Irvine e Alexander, 1994; van der Kolk et al. 2001*).

Il CRH è il primo ormone dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene ad essere coinvolto nella risposta allo stress. Qualsiasi forma di stress fisico, chimico, termico, microbiologico... comporta un'intensa stimolazione del suo rilascio. Il CRH, accumulato in granuli secretori a livello dei nuclei paraventricolari dell'ipotalamo, viene quindi immesso nel circolo portale ipotalamo-ipofisario e raggiunge così le cellule della pars distalis dell'adenoipofisi dove si lega

agli specifici recettori di membrana, attivando l'adenilciclasi citoplasmatica con conseguente incremento del cAMP e liberazione di ACTH.

La secrezione di tale ormone dalle cellule della pars intermedia è invece primariamente controllato dalla dopamina con un meccanismo inverso, ovvero basse concentrazioni di dopamina ne stimolano la sintesi ed il rilascio.

Altri fattori ormonali che agiscono sinergicamente con il CRH nello stimolare la sintesi e secrezione dell'ACTH includono: vasopressina, catecolamine, angiotensina, serotonina e molti ormoni gastrointestinali.

I glicocorticoidi agiscono con un meccanismo di *feedback negativo a lungo raggio* sull'ipotalamo inibendo la secrezione di CRH in relazione all'aumento della concentrazione di cortisolo nel sangue; al contrario una riduzione dei livelli ematici di cortisolo stimola la secrezione ipotalamica.

Un secondo meccanismo di regolazione è rappresentato dal *feedback negativo a corto raggio* che elevate concentrazioni di cortisolo inducono direttamente sulla secrezione di ACTH adenipofisario.

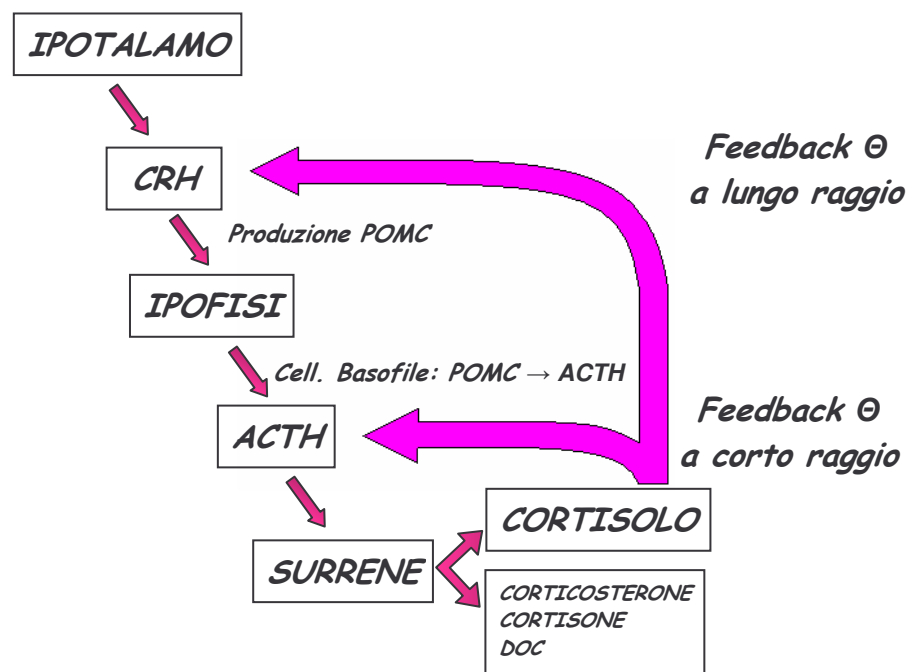


Fig. 2: Asse Ipotalamo-Ipofisi-Surrene; meccanismo di regolazione, feedback negativo.

Poiché le cellule corticotrope della pars intermedia sono sotto il controllo della dopamina, a questo livello la secrezione di ACTH è indipendente dalla concentrazione ematica di cortisolo; ciò nel cavallo riveste una notevole rilevanza clinica poiché in questa specie una delle più frequenti forme di iperadrenocorticismo (Sindrome di Cushing) è secondaria all'ipersecrezione di ACTH da adenomi a carico della pars intermedia della ghiandola ipofisaria (*Beech et al. 1987; Wilson et al. 1982; Couëttil, Paradis and Knoll, 1996*).

L'ACTH esercita un'azione trofica e stimolante la secrezione di tutti gli ormoni adrenocorticali (glicocorticoidi, mineralcorticoidi, ormoni sessuali) potendo interagire con recettori cellulari presenti nei corticociti della zona glomerulosa, fascicolata e reticolare; tuttavia, poiché sintesi e liberazione di aldosterone dalla zona glomerulosa sottostanno anche e soprattutto al controllo indipendente esercitato dall'angiotensina II, il solo effetto sulla zona fascicolata e reticolare risulta particolarmente manifesto.

A questo livello l'ormone adrenocorticotropo induce l'attivazione di protein-kinasi che a loro volta promuovono, con un meccanismo di up-regulation recettoriale, la captazione di colesterolo ed il suo accumulo in gocce lipidiche; esse attivano inoltre i sistemi enzimatici responsabili della conversione del colesterolo in ormoni steroidei.

Gli effetti trofici dell'ACTH sulla corticale surrenale, che sembrano peraltro essere mediati dalla presenza di IGFs a livello locale, si dividono in: rapidi, a breve termine e a lungo termine potendosi temporalmente manifestare rispettivamente nell'ordine di secondi o minuti, ore o giorni, settimane o mesi. Sono soprattutto gli effetti a lungo termine, che si instaurano per esempio per stimoli stressogeni cronici o terapie cortisoniche di lunga durata, a rivestire la maggior rilevanza nella pratica clinica, in quanto possono determinare con il tempo l'atrofia della ghiandola surrenale compromettendone chiaramente la

funzionalità cosa che si manifesta clinicamente con l'incapacità dei soggetti a reagire anche al minimo stress.

2.3.Mineralcorticoidi

Il principale ormone mineralcorticoide è l'aldosterone che viene sintetizzato e secreto esclusivamente dalle cellule della zona glomerulosa della corteccia surrenale. La sua funzione principale è la regolazione del bilancio idrico ed elettrolitico nel compartimento extracellulare, incrementando il riassorbimento renale di sodio e l'escrezione di potassio nelle urine.

Altri ormoni corticosurrenali hanno una debole azione mineraloattiva e sono: corticosterone, desossicorticosterone (DOC) e 18-idrossicorticosterone. In realtà sono glicocorticoidi secreti dalla zona fascicolata e come tali sottostanno al controllo dell'ACTH ipofisario.

Come i glicocorticoidi, corticosterone e DOC sono veicolati nel circolo ematico da proteine di trasporto quali l'albumina e la transcortina e quindi l'azione mineraloattiva si manifesta solo ad elevate concentrazioni, mentre la maggior parte di aldosterone circola libero e perciò direttamente in forma attiva; tutti comunque diffondono passivamente attraverso le membrane cellulari dopo essersi legati ai recettori delle specifiche cellule bersaglio. Queste sono rappresentate principalmente dalle cellule epiteliali dei tubuli collettori renali dove i mineralcorticoidi attivano le pompe $\text{Na}^+\text{-K}^+$ con conseguente riassorbimento di sodio, accoppiato a sua volta all'escrezione di ioni K^+ e H^+ . Con lo stesso meccanismo e funzione agiscono anche a livello delle cellule epiteliali di: stomaco, colon e dotti delle ghiandole salivari, lacrimali e sudoripare.

Quindi le funzioni principali dei mineralcorticoidi si possono considerare in ordine di importanza: il mantenimento della quantità di liquido extracellulare,

della volemia e perciò anche della pressione sanguigna, e secondariamente il controllo della kaliemia e della natriemia e di conseguenza dell'eccitabilità neuro-muscolare e miocardica.

2.3.1. Regolazione della secrezione di aldosterone

La concentrazione basale dei mineralcorticoidi è scarsamente influenzata dal sistema nervoso e quindi dal controllo ipotalamico del rilascio di ACTH ipofisario, mentre è condizionata, come quella dei glicocorticoidi, dai ritmi circadiani (alternanza fasi sonno-veglia), risultando maggiore la mattina negli animali diurni come il cavallo.

I due principali meccanismi che regolano la sintesi e secrezione dell'aldosterone dalla zona glomerulosa adrenocorticale sono: il sistema renina-angiotensina e le variazioni di concentrazione di Na^+ e K^+ nei liquidi extracellulari.

La zona sensibile è localizzata a livello renale ed è rappresentata dall'apparato iuxta-glomerulare e dalla macula densa. L'apparato iuxta-glomerulare è costituito da cellule muscolari modificate che circondano le arteriole afferenti glomerulari e che sintetizzano e liberano renina soprattutto in risposta alla diminuzione della pressione ematica; la macula densa, costituita da cellule epiteliali specializzate situate a livello del tubulo distale renale, è in contatto con le arteriole glomerulari e con l'apparato iuxta-glomerulare ed è responsabile del monitoraggio della concentrazione tubulare di ioni Na^+ , K^+ e Cl^- .

La renina è una proteina ad azione peptidasica la cui concentrazione ematica costituisce il principale modulatore della produzione e del rilascio di aldosterone.

Il substrato per la renina è l'angiotensinogeno di cui provoca la scissione in angiotensina I biologicamente inattiva; l'angiotensina I è trasformata in

angiotensina II ad opera di un enzima convertente (ACE) localizzato in vari tessuti e in particolare a livello dell'endotelio vasale polmonare; l'angiotensina II si lega ai recettori dei corticociti della zona glomerulosa, promuovendo la sintesi e la secrezione dei mineralcorticoidi mediante la stimolazione degli enzimi che convertono il colesterolo in pregnenolone e il corticosterone in aldosterone. L'angiotensina II è inoltre responsabile del feedback negativo verso le cellule iuxta-glomerulari, inibendo il rilascio di renina; è un potente agente vasocostrittore; agisce sul sistema nervoso centrale stimolando il centro della sete ed infine promuove la liberazione di vasopressina (ADH) ed ACTH ipotalamici.

I fattori che maggiormente incentivano la secrezione di renina sono: l'iponatriemia, l'ipovolemia, la riduzione della pressione sanguigna e l'attività simpatica; stimolano inoltre il suo rilascio le catecolamine, l'iperkaliemia e le prostaglandine, ed infine la sua sintesi è promossa da estrogeni e glicocorticoidi.

2.4.Catecolamine

Le cellule cromaffini della midollare del surrene producono e riversano in circolo adrenalina (Adr), noradrenalina (NAdr) e piccole quantità di dopamina (Dop). A questo livello le catecolamine hanno il ruolo fisiologico di ormoni e come tali sono riversate direttamente nel sangue. Esse tuttavia vengono prodotte anche a livello del S.N.C. dove assumono la funzione di neurotrasmettitori.

Tutte vengono sintetizzate a partire dall'aminoacido tirosina che viene captato dal sangue e che ha prevalentemente un'origine dietetica. La tirosina viene prima decarbossilata in Dopa e quindi nei suoi derivati che sono in successione: Dop, NAdr, Adr.

Una volta sintetizzate, le catecolamine vengono immagazzinate in granuli secretori. L'accumulo ed il rilascio dalle cellule cromaffini sono processi attivi che richiedono energia, sotto forma di ATP, e presenza di adeguate concentrazioni di Ca^{+} endocellulare.

Una volta riversate nel sangue circolano in forma libera o labilmente legate a proteine plasmatiche ed hanno un'emivita brevissima di circa 2 minuti. Le catecolamine vengono infine inattivate soprattutto a livello renale ed epatico attraverso l'azione combinata di enzimi citoplasmatici metilanti (COMT: catecolamino-orto-metil-tranferasi) e mitocondriali ossidanti (MAO: monoaminossidasi) ed i metaboliti inattivi, una volta coniugati, sono eliminati con la bile e le urine. A livello dei terminali sinaptici, la noradrenalina viene in parte recuperata attraverso un meccanismo di trasporto attivo.

2.4.1. Regolazione della secrezione delle catecolamine midollari

Adrenalina e noradrenalina sono prodotte in proporzioni diverse a seconda della specie animale e nello stesso animale in risposta a diverse situazioni di stimolo; ipoglicemia, freddo, dolore inducono una maggior secrezione di Adr, mentre ansia, ipotensione ed ipossia determinano un'elevata produzione di NAdr. In generale il controllo della loro secrezione è quasi esclusivamente nervoso e le risposte evocate dalla loro liberazione, in particolare dell'adrenalina, coinvolgono in modo ubiquitario l'organismo con grosso dispendio energetico; da qui l'importanza della rapida inattivazione.

Pur essendo primariamente implicate nel meccanismo di risposta allo stress acuto, la distruzione della midollare delle surreni non comporta gravi inconvenienti nella vita dell'animale, che tuttavia risulta incapace di rapido adattamento metabolico a situazioni di emergenza, presenta scarsa resistenza alla fatica ed inefficace termoregolazione contro il freddo; questo perchè la concentrazione di adrenalina si riduce mentre quella della noradrenalina resta

pressoché invariata. Inoltre dopo qualche mese dalla distruzione della midollare l'adrenalina circolante risale a valori nella norma in quanto il tessuto cromaffine extrasurrenalico acquista la capacità di sintetizzarla. Al contrario, poiché i glicocorticoidi promuovono la trasformazione di noradrenalina in adrenalina, in animali cronicamente stressati la concentrazione ematica di adrenalina tende ad aumentare.

Gli effetti principali delle catecolamine sono: iperglicemizzante, lipolitica, eccitometabolica e calorigena. Queste funzioni sono strettamente correlate con quelle di altri ormoni di cui possono stimolare o inibire la secrezione attraverso variazioni del flusso ematico o per azione diretta sulle cellule secernitrici. In particolare l'adrenalina esercita un'attività inibitoria verso l'insulina per inibizione della secrezione delle cellule β -pancreatiche, mentre favorisce la liberazione di glucagone che a sua volta stimola il rilascio di ulteriori quote di catecolamine a livello surrenalico. L'aumento di concentrazione di adrenalina è associata a quella di CRH ed ACTH con conseguente incremento dei glicocorticoidi che a loro volta ne potenziano gli effetti. Le catecolamine stimolano la secrezione di ormoni tiroidei indispensabili per sostenere alcuni loro effetti come quello calorigeno e quelli cronotropi, batmotropi, dromotropi ed inotropi positivi sul cuore. Infine favoriscono la liberazione di aldosterone per azione diretta sull'apparato iuxta-glomerulare dove promuovono la secrezione di renina, mentre inibiscono a livello centrale e periferico il rilascio di ADH.

2.5. Disfunzioni della corteccia surrenalica nel cavallo

2.5.1. Iperadrenocorticismo

Nel cavallo la forma più comunemente riscontrata di iperadrenocorticismo è legata all'ipertrofia-iperplasia-adenoma ipofisario a carico della pars intermedia.

Questa patologia, meglio conosciuta con il nome di Sindrome di Cushing, è caratterizzata da un iperadrenocorticismo secondario all'ipersecrezione di ormone adrenocorticotropo (ACTH) ipofisi-dipendente (*Orth et al. 1982; Wilson et al. 1982; Love, 1993*).

Sebbene tale sindrome abbia caratteristiche cliniche simili a quella riscontrata nell'uomo, nel cavallo, contrariamente a quanto avvenga nella specie umana, la localizzazione anatomica della lesione è il lobo intermedio e solo raramente il lobo anteriore, inoltre diversi sembrano essere i meccanismi implicati nella conversione della proopiomelanocortina (POMC) nei suoi derivati (*Orth et al. 1982*) fra cui appunto l'ACTH.

Nonostante la relativa frequenza di tale sindrome nel cavallo, la maggior parte delle diagnosi di adenoma ipofisario avviene post-mortem, poiché molti soggetti possono non manifestare una sintomatologia eclatante.

La Sindrome di Cushing del cavallo è comunque documentata in tutte le razze e in entrambi i sessi, sebbene in molti studi sia riportata una prevalenza nelle femmine (*Beech et al. 1987; Boujon et al. 1993*). I soggetti anziani risultano essere maggiormente colpiti soprattutto dalle forme tumorali.

Le manifestazioni cliniche sono principalmente correlate alla stimolazione secondaria della corticale surrenale e conseguente incremento della concentrazione ematica di cortisolo (*Orth et al. 1982*).

La sintomatologia è caratterizzata da: perdita di peso, nonostante l'incremento di appetito; poliuria e polidipsia, iperidrosi, irsutismo e scadente qualità del

mantello associati a xerosi cutanea (*Thompson et al. 1995*). I soggetti presentano inoltre perdita del tono e delle masse muscolari con conseguente debolezza, addome pendulo ed atrofia dei muscoli soprattutto del dorso e della groppa. In alcuni cavalli è riscontrabile un caratteristico rigonfiamento delle fossette retrorbitali per abnorme accumulo di tessuto adiposo. Molti soggetti presentano infezioni cutanee e/o sistemiche recidivanti che possono esitare in laminiti croniche refrattarie ai trattamenti; tale suscettibilità alle infezioni è legata alla compromissione delle difese immunitarie secondaria all'ipercortisolemia. Ulteriori sequele dell'iperadrenocorticismo sono legate all'alterazione dell'attività riproduttiva (*Love, 1993*) e all'iperglicemia persistente ed insulino-resistente che può esitare in diabete di tipo2 (*van der Kolk et al. 1993b*).

È infine opportuno tener presente che l'iperadrenocorticismo può non avere un'origine organica ma essere secondario a somministrazione iatrogena di terapie cortisoniche di lunga durata; in questo caso sia l'ipofisi anteriore che l'intermedia e le surreni risulteranno ipotrofiche, paradossalmente come nell'ipoadrenocorticismo.

2.5.2. Ipoadrenocorticismo

È una forma di ipofunzionalità corticosurrenalica di raro riscontro nel cavallo così come nelle altre specie animali.

Si distingue in: primario, se è la distruzione della zona fascicolata e reticolare o meno frequentemente di tutta la corticale del surrene, a determinare una ridotta secrezione di glicocorticoidi e mineralcorticoidi; secondario, se l'atrofia della corticale surrenalica è dovuta ad un'iposecrezione di ACTH ipofisario; iatrogeno se l'ipocorticosurrenalismo si manifesta dopo la brusca interruzione di lunghi trattamenti con farmaci cortisonici, poiché in tal caso l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene risulta incapace di rispondere all'improvvisa

carezza di glicocorticoidi, la cui produzione endogena viene sospesa dall'organismo durante il periodo di trattamento.

2.6.Asse ipotalamo-ipofisi-surrene nel feto equino

2.6.1. Ruolo dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene nel feto equino

Nelle ultime settimane di gestazione il processo di maturazione fetale subisce un'accelerazione notevole per l'attivazione di una sorta di meccanismo di "accensione" dei diversi sistemi fisiologici essenziali per la vita post- natale. In tale meccanismo gioca un ruolo determinante la maturazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene e di tutti i processi metabolici ad essa correlati, oltre ad altre modificazioni endocrine che devono essere considerate altrettanto importanti (*Liggins, 1994; Fowden, 1995*)

Contrariamente a quanto osservato in altre specie, dove gli elevati livelli della cortisolemia sono implicati direttamente nell'indurre la cascata di eventi ormonali che esitano nel parto (*Challis et al. 1999*), nel cavallo non è ancora chiaro se e con quale meccanismo i corticosteroidi siano coinvolti nel determinismo del parto.

È comunque noto che la produzione di cortisolo, che nel feto equino aumenta solo in prossimità del parto, sia implicata nel completamento di numerosi processi maturativi: induzione degli enzimi gluconeogenetici e conseguente accumulo di glicogeno epatico (*Fowden et al., 1991*), incremento della concentrazione di triiodiotirosina fetale (*Silver et al., 1991*), stimolazione dell'attività simpatica della midollare del surrene (*Silver et al., 1984*), aumento della pressione ematica e della concentrazione plasmatica dell'enzima angiotensina-convertente (*Forhead et al., 2000*), attivazione

dell'emopoiesi e di neutrofili specifici (*Silver and Fowden, 1994*). Nel puledro la produzione di cortisolo molto probabilmente regola anche la maturazione morfologica e funzionale dei polmoni e dell'apparato gastroenterico sebbene non siano ancora stati condotti studi specifici in merito (*Fowden, 1995*).

Un'adeguata produzione di cortisolo in prossimità del parto è quindi requisito essenziale per la sopravvivenza post-natale; questo relativo ritardo nell'attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene implica una possibile compromissione della sopravvivenza neonatale anche se il parto avviene solo pochi giorni prima del termine previsto, giustificando la maggior incidenza di dismaturità/prematurità nei puledri rispetto a quanto si verifica nei neonati di altre specie. Infatti, puledri nati prima che avvenga il fisiologico incremento della cortisolemia pre-parto, mostrano una scarsa vitalità e di solito muoiono per deficienze anatomico-funzionali che coinvolgono molti organi (*Rossdale et al. 1984; Silver, 1990, 1992; Ousey et al. 1998*).

2.6.2. Il surrene nel feto equino (*Fowden and Silver, 1995*)

In tutte le specie le dimensioni ed il peso della ghiandola surrenale aumentano con il progredire della gestazione ed in particolare nel feto equino il suo peso duplica nell'arco dell'ultimo 5% della gestazione, passando da 60mg/kg di peso vivo fetale a 300 giorni, a 100mg/Kg di peso vivo fetale a termine (ca. 335 giorni).

La maggior dimensione della corticale del surrene è imputabile primariamente all'aumento di spessore della zona fascicolata; a questo livello le modificazioni strutturali dei corticociti avvengono in parallelo all'induzione dei sistemi enzimatici per la sintesi degli specifici ormoni steroidei coinvolti nell'attivazione funzionale della ghiandola surrenale al termine della gestazione. I tre sistemi enzimatici chiave che intervengono nella

steroidogenesi, conversione del precursore colesterolo prima in pregnenolone e quindi in cortisolo, sono: P450_{scc}, 3 β -idrossisteroide-deidrogenasi (3 β -HSD) e 17 α -idrossilasi (P450_{c17}) e l'induzione di questi enzimi nel feto equino è molto prossima al parto (*Han et al. 1995*).

È stata evidenziata una correlazione diretta tra le modificazioni cellulari ed enzimatiche e l'incremento della concentrazione di cortisolo nella tarda gravidanza ed è stato visto che nel feto equino la concentrazione di cortisolo plasmatico rimane bassa fino a 4-5 giorni prima del termine e cresce esponenzialmente solo 24-36 h prima del parto (*Silver and Fowden, 1994*).

2.6.3. Steroidogenesi

Il surrene fetale sembra essere la principale fonte di pregnenolone (P₅) come mostrano gli alti livelli di questo steroide ipofisi-dipendente nel sangue arterioso del feto equino (*Thorburn, 1993*). Il pregnenolone viene utilizzato: dal surrene fetale per la sintesi di glicocorticoidi e dalla fattrice, attraverso la captazione tramite la placenta, per sintetizzare progesterone ed altri progestageni rinvenuti nella circolazione ombelicale ed uterina durante la gravidanza (*Holtan et al. 1991*). La conversione di colesterolo in P₅ avviene a partire dai 150 giorni di gravidanza ed aumenta con il suo progredire (*Han et al. 1995*).

La concentrazione dei progestageni materni e di pregnenolone fetale diminuiscono bruscamente in concomitanza con l'incremento della cortisolemia a termine e questo supporta l'ipotesi che la ghiandola surrenale sia un importante componente steroidogenetica dell'unità feto-placentare per la sintesi di progestageni durante l'ultimo terzo della gravidanza e che al termine della gestazione la sintesi di cortisolo sia privilegiata al fine di permettere una corretta maturazione dei tessuti fetali.

È inoltre opportuno considerare che l'azione dei glicocorticoidi a livello degli organi bersaglio è legata soprattutto alla quota di cortisolo libero, non veicolato dalle globuline di trasporto (CBG), e quindi immediatamente disponibile per i tessuti in maturazione.

Durante la gravidanza, nel feto equino, la concentrazione ematica di CBG è elevata e il tasso di cortisolo libero si riduce al 5-20% del totale (*Irvine e Alexander, 1987; Berdusco et al. 1995; Cudd et al. 1995*); ciò probabilmente serve a limitare la quantità di ormone, in forma attiva, a quella effettivamente necessaria.

Al contrario negli ultimi dieci giorni che precedono il parto i livelli di CBG plasmatiche diminuiscono drasticamente, favorendo l'ulteriore sintesi e rilascio di cortisolo dalla corticale del surrene e il rapido incremento della quota libera immediatamente utilizzabile dai tessuti (*Silver and Fowden, 1995*).

2.6.4. Meccanismi di regolazione della corticale del surrene

L'ACTH è il principale ormone ad azione trofica sulla corticale del surrene e la sua carenza in utero comporta l'atrofia della ghiandola surrenale fetale con conseguente blocco dei processi maturativi che avvengono a questo livello al termine della gestazione (*Robinson et al. 1983; Silver, 1990*).

La sensibilità della corticale del surrene all'azione dell'ACTH endogeno ed esogeno cresce parallelamente all'incremento di cortisolo plasmatico pre-parto, tuttavia la concentrazione ematica dell'ormone adrenocorticotropo pur aumentando progressivamente verso il termine, non subisce incrementi significativi fino al giorno del parto. Di conseguenza si ipotizza che altri meccanismi siano coinvolti, insieme all'ACTH, nell'attivazione della funzionalità del surrene durante la gravidanza e fra questi è stato indagato il ruolo delle prostaglandine (PGE₂).

Queste mostrano la capacità diretta di evocare la secrezione di cortisolo e la loro concentrazione si eleva in parallelo a quella del cortisolo al termine della gestazione (*Challis et al. 1993; Fowden et al. 1994*).

Nella pecora è stata messa in evidenza la presenza di due forme a diverso peso molecolare di ACTH; il primo tipo, ad elevato peso molecolare, sembra prevalere per tutta la gestazione ed avere una bassa attività stimolante sulla corticale del surrene; il secondo, a basso peso molecolare, possiede un'attività biologica maggiore e la sua concentrazione sale negli ultimi venti giorni di gestazione precedendo l'incremento della cortisolemia (*Challis et al. 1993*).

Sebbene non ci sia un riscontro scientifico analogo nel feto equino, la presenza di una diversa forma molecolare di ACTH circolante potrebbe spiegare, anche in questa specie, l'incrementata sensibilità dei corticociti all'ACTH al termine della gestazione e perché, in questa fase, il colesterolo venga selettivamente convertito in cortisolo piuttosto che in altri ormoni steroidei.

L'aumento della sensibilità dei corticociti all'azione dell'ACTH è correlata a numerosi fattori: in parte alle variazioni strutturali ed enzimatiche delle cellule della zona fascicolata che avvengono al termine della gravidanza; in parte all'aumento del numero di recettori specifici per l'ACTH sulla superficie dei corticociti e allo sblocco del sistema adenilato-ciclasa- ACTH dipendente ad essi accoppiato (*Thorburn, 1993*); infine al completamento dell'innervazione del surrene che nel puledro avviene solo in prossimità del parto (*Silver and Edwards, 1980; Silver and Fowden, 1994*).

La maggior parte di questi meccanismi risultano dipendenti dalla concentrazione plasmatica del cortisolo e dalla sua produzione in loco, mentre altri sono mediati da insulin-like growth factors (IGFs) ed in particolare dall'IGF-tipo II. L'IGF-II riveste un importante ruolo nello stimolo alla

proliferazione e differenziazione delle cellule della zona fascicolata e la sua presenza a questo livello si riduce in concomitanza alle modificazioni morfologiche e steroidogenetiche dei corticociti al termine della gestazione (*Fowden, 1995*).

La regolazione dello sviluppo della corticale del surrene è quindi mediata da un insieme di fattori ormonali che agiscono sia con meccanismo apocrino, sistemico, che autocrino e paracrino, locale.

2.6.5. Sviluppo dell'ipofisi fetale

Le cellule corticotrope si ritrovano nell'ipofisi del feto equino a partire dalla seconda metà della gestazione e, durante questo periodo, la loro morfologia e quantità non varia, rappresentando il 10-15% della popolazione cellulare della pars distalis ipofisaria (*Webb, 1982*). Esse sono costituite da due diverse forme: una è tipicamente fetale ed è quella predominante durante la gravidanza, mentre l'altra è simile a quella dell'adulto e la sua quantità aumenta, parallelamente all'incremento del cortisolo e dell'ACTH a termine (*Antolovich et al. 1989*).

Nel feto le cellule corticotrope ipofisarie sono deputate, così come avviene nell'adulto, alla conversione del POMC in derivati peptidici come l'ACTH.

Nel feto di pecora si è visto che la sintesi di POMC aumenta fino al termine della gestazione per poi diminuire in prossimità del parto in corrispondenza del picco della cortisolemia; questo fa supporre che l'ipofisi fetale sia in questa fase sensibile al feedback negativo a lungo raggio esercitato dal cortisolo (*McMillen et al. 1990*) che non sembra invece influenzare la concentrazione dell'ACTH plasmatico che continua ad aumentare progressivamente. Per quanto riguarda il puledro, nonostante siano stati identificati i derivati peptidici della POMC, sono ancora sconosciuti gli eventi metabolici ed i meccanismi che regolano l'espressione genica delle cellule

corticotrope in relazione alla maturazione fetale negli ultimi giorni che precedono il parto.

2.6.6. Regolazione della secrezione di ACTH

Nel feto equino, in condizioni basali, l'ACTH è rilasciato dalle cellule corticotrope in modo pulsatile con la frequenza di un picco ogni 11-17min.

Fino a quindici giorni dal parto la massima concentrazione di ACTH raggiunta per ogni pulsazione non è comunque sufficiente ad evocare un incremento della cortisolemia.

Con l'approssimarsi del parto aumenta l'ampiezza dei picchi, ma non la loro frequenza, e all'incremento della concentrazione di ACTH corrisponde quello del cortisolo (*Silver and Fowden, 1994; Cudd et al. 1995*).

Stimoli stressogeni come ipoglicemia, ipossia o ipotensione possono modificare la secrezione ipofisaria di ACTH, evocando tuttavia una risposta diversa a seconda che intervengano nella prima o nell'ultima parte della gestazione. Per esempio, mentre negli ultimi dieci giorni che precedono il parto, l'ipoglicemia induce un rapido e marcato picco di ACTH plasmatico in corrispondenza della concentrazione minima di glucosio, questo stesso stimolo nella prima parte della gestazione provoca un incremento di ACTH piccolo e ritardato.

Come nel cavallo adulto, la secrezione di ACTH dall'ipofisi è stimolata primariamente dal fattore di rilascio ipotalamico (CRH) e secondariamente dalla vasopressina (ADH); entrambi gli ormoni sono presenti nel sangue fetale equino nella tarda gestazione (*Holdstock, 1995*).

Normalmente l'elevata cortisolemia esercita su CRH e ADH un feedback negativo, inibendone il rilascio e di conseguenza riducendo la successiva liberazione di ACTH ipofisario, ma, poiché nel feto l'incremento del tasso di cortisolo che avviene a termine non è seguito da una riduzione della

secrezione di ACTH, altri meccanismi sono probabilmente coinvolti nella regolazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene durante la vita intrauterina.

Queste osservazioni suggeriscono due ipotesi: la prima è che il cortisolo nel feto possa esplicare un effetto diverso sulla sintesi e la secrezione ipofisaria dei derivati della proopiomelanocortina rispetto a quanto avvenga nell'adulto; la seconda è che vi siano sedi ectopiche, diverse dalla pars distalis dell'ipofisi, deputate alla secrezione di ACTH, e fra queste si è ipotizzata una secrezione da parte della placenta, del polmone o del surrene stesso.

3. GLI ORMONI DELLA TARDA GRAVIDANZA NELLA CAVALLA:

I fattori che maggiormente condizionano il buon esito del parto e la nascita di un puledro vivo e vitale derivano dalla coordinazione degli eventi endocrini che regolano lo sviluppo fetale e materno. Gli ormoni coinvolti nella formazione di un idoneo ambiente uterino sono numerosi ed intervengono in un ordine ben preciso.

In linea generale, il profilo endocrino della fattrice a termine è caratterizzato da concentrazioni plasmatiche crescenti di progestageni e decrescenti di estrogeni.

In realtà la maggior parte degli ormoni materni circolanti é metabolizzata dal feto e dall'unità utero-placentare che, insieme, possiedono gli enzimi necessari per la trasformazione dei precursori nei derivati biologicamente attivi.

Gli ormoni steroidei della gravidanza sono pertanto prodotti a partire da precursori materni e fetali, metabolizzati dalla placenta ed esplicano la loro azione a livello dell'utero materno (*Ousey, 2004*).

3.1.Ormoni che promuovono l'attività contrattile del miometrio

3.1.1. Ossitocina e Prostaglandine

L'ossitocina e le prostaglandine ($\text{PGF}_{2\alpha}$) sono i principali responsabili nel dare inizio all'attività contrattile del miometrio al momento del parto, in presenza di adeguate concentrazioni ematiche di estrogeni e progesterone (*Rossdale et al. 1979; Ousey et al. 2000a*).

Nella pratica clinica, soprattutto l'ossitocina può essere utilizzata per indurre il parto; tuttavia se il parto viene indotto prima che siano presenti i segni della gravidanza a termine (adeguato stato di riempimento della mammella, presenza delle "perle" al capezzolo, giusta composizione elettrolitica del secreto mammario...), il puledro nascerà probabilmente prematuro con tutte le conseguenze cliniche che ciò comporta. La sensibilità materna a questi agenti utero-tonici aumenta con l'avanzare della gestazione, pertanto l'induzione al momento opportuno permetterà anche di utilizzare dosi efficaci inferiori (*Camillo et al. 2000; Chavatte-Palmer et al. 2002*).

Le prostaglandine prodotte dai tessuti utero-placentari sono di due tipi: le $\text{PGF}_{2\alpha}$, che all'inizio della gravidanza hanno un'attività luteolitica e che a termine stimolano la contrazione del miometrio e le PGE_2 che al momento del parto promuovono la dilatazione della cervice. Entrambe sono sintetizzate dal tessuto utero placentare e mantenute a basse concentrazioni ematiche durante la seconda metà della gravidanza.

L'inibizione delle $\text{PGF}_{2\alpha}$, mediante inattivazione endometriale, ha lo scopo di prevenirne gli effetti potenzialmente abortigeni legati ad un'attivazione precoce rispetto al completamento della maturazione fetale.

La concentrazione di $\text{PGF}_{2\alpha}$ comincia ad aumentare durante la prima fase preparatoria del parto e subisce un ulteriore incremento durante la fase espulsiva (*Vivrette et al. 2000*).

Nella donna, la sintesi di prostaglandine è stata correlata all'incremento della secrezione di glicocorticoidi e di estrogeni dai tessuti utero-placentari (*Challis and Hooper, 1989*).

Infatti da studi condotti sulla specie umana è emerso che l'incremento della cortisolemia fetale a termine agisce, con un meccanismo diretto sulla placenta, promuovendo la sintesi e la secrezione di prostaglandine e che a sua volta l'incremento delle prostaglandine stimola: l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, l'up-regulation recettoriale verso l'11 β -HSD di tipo 1 a livello placentare (che promuove la conversione del cortisone in cortisolo) e la produzione di estrogeni (*Challis et al. 2001; Alfaidy et al. 2001; Challis et al. 2002*).

Nella cavalla sicuramente gli estrogeni ed il progesterone rivestono un ruolo importante nel preparare il miometrio all'attività contrattile inducendo un incremento dei recettori per l'ossitocina ed il suo rilascio durante il parto; i progestageni sono inoltre coinvolti nella regolazione dell'enzima 15-idrossiprostaglandina-deidrogenasi (PGDH) responsabile dell'inattivazione delle PGF_{2 α} e presente nell'endometrio a partire da circa 150 giorni di gestazione; pertanto il declino dei progestageni a termine potrebbe agire con meccanismo paracrino, inibendo l'enzima e quindi stimolando, indirettamente, la sintesi delle prostaglandine necessarie per dare inizio all'attività contrattile del miometrio al momento del parto (*Han et al. 1995a*).

La concentrazione plasmatica dell'ossitocina segue un andamento simile a quello delle prostaglandine: livelli basali per tutta la gravidanza e significativo incremento solo al momento della rottura dell'allantocorion, con valori massimi indotti dal riflesso di Ferguson durante la fase espulsiva (*Vivrette et al. 2000*).

3.1.2. Estrogeni

La presenza degli estrogeni non è essenziale per il mantenimento della quiescenza uterina durante la gravidanza, ma lo è per il determinismo del parto.

L'andamento della concentrazione ematica degli estrogeni ed il tipo di ormoni appartenenti a questa classe sono caratteristici della specie equina.

Nella cavalla, si individuano due tipi di estrogeni circolanti: estrogeni fenolici (estrone, 17β -estradiolo e 17α -estradiolo) ed estrogeni insaturi a struttura ciclica, caratteristici della specie (equilina ed equilenina); sono infine presenti anche alcuni idrossi-derivati (es: 17β -idrossiequilenina) e sulfo-coniugati (es: estrone solfato).

Il precursore di tutti gli estrogeni è il deidroepiandrosterone (DHA) prodotto dalle gonadi fetali in accrescimento, grazie alla presenza a questo livello degli enzimi che lo sintetizzano a partire dal colesterolo (P450scc e 17α -idrossilasi) (*Pashen et al. 1982*).

Il DHA viene successivamente riversato nell'arteria ombelicale e convertito, da aromatasi placentari, negli estrogeni derivati.

Poiché la biosintesi degli estrogeni totali richiede l'intervento sia del feto che della placenta, il dosaggio di questi ormoni, in particolare dell'estrone solfato, può essere utilizzato per il monitoraggio della vitalità dell'unità feto-placentare (*Sist et al. 1987*).

Per quanto riguarda l'andamento, nella cavalla gravida, la concentrazione di estrogeni totali comincia ad aumentare intorno ai 100giorni di gestazione e rimane elevata fino agli ultimi 2-3 mesi (livelli massimi a circa 200-250giorni), diminuendo poi gradualmente fino al parto (*J.C Ousey, 2004*).

Questo profilo riflette quello dei precursori la cui concentrazione aumenta e diminuisce in rapporto all'ipertrofia e successiva regressione delle gonadi fetali (*Pashen and Allen, 1979; Raeside et al. 1997*).

La stretta interdipendenza tra vitalità fetale e produzione di estrogeni è confermata dal fatto che la gonadectomia fetale compiuta nella tarda gestazione comporta una repentina caduta della concentrazione plasmatica materna degli estrogeni totali, deboli ed inefficaci contrazioni durante l'espulsione, associate a bassi livelli di prostaglandine e l'eventuale nascita di puledri dismaturi.

Durante la gravidanza, gli estrogeni promuovono l'accrescimento uterino, placentare e fetale.

A termine, l'incremento di estrogeni, come dimostrato in altri mammiferi domestici, stimola la produzione di prostaglandine e la sintesi di recettori per l'ossitocina, promuovendo indirettamente la contrattilità del miometrio (*Silver, 1990; Egarter and Husslein, 1992*).

Nei primati è stato inoltre osservato che gli estrogeni mediano l'incremento dell'ossitocina e quindi il passaggio dalle contrazioni deboli ed inefficaci, presenti per tutta la gestazione, a quelle energiche e frequenti proprie della fase espulsiva del parto (*Nathanielsz et al. 1995*).

Nella specie equina è stata evidenziata un'attività elettromiografica crescente nelle ultime settimane di gestazione, soprattutto di notte, in relazione all'incremento del 17β -estradiolo circolante (*Haluska and Currie, 1988; O'Donnell et al. 2003*); pertanto si ipotizza che, a prescindere dal declino nella circolazione periferica materna degli estrogeni totali, ci siano degli estrogeni specifici in grado di agire localmente sui tessuti utero-placentari promuovendo il rilascio di prostaglandine e ossitocina e la conseguente attività contrattile del miometrio.

3.2.Ormoni che regolano la quiescenza dell'utero

3.2.1. Relaxina

La relaxina è un ormone prodotto durante la gravidanza principalmente dai trofoblasti placentari (*Klonisch and Hombach-Klonisch, 2000*); pertanto la sua concentrazione nel plasma materno comincia ad aumentare a circa 80 giorni di gestazione quando la placenta, a sua volta, inizia ad espandersi e a diventare autonoma per quanto riguarda la secrezione di un'ampia varietà di ormoni.

Il tasso plasmatico di relaxina tende a rimanere elevato fino al termine della gestazione.

Sebbene si ritenga che la sua funzione sia quella di favorire la quiescenza uterina, paradossalmente durante la fase attiva del parto la sua concentrazione subisce un ulteriore incremento (*Stewart et al. 1984; Ousey, 2004*); per giustificare tale andamento è stato ipotizzato che l'incremento della relaxina a termine contribuisca al breve periodo di quiescenza uterina (2-4h) che si verifica prima dell'espulsione, preparando il miometrio alla successiva fase di energica attività contrattile (*Haluska et al. 1987*).

Haluska e collaboratori (1987) hanno inoltre suggerito che sia necessaria un'elevata concentrazione locale di $\text{PGF}_{2\alpha}$, perché la relaxina possa esercitare il proprio effetto miorilassante.

Dopo il parto la concentrazione plasmatica materna di relaxina diminuisce gradualmente, ma può rimanere elevata in caso di ritenzione placentare.

3.2.2. Progesterone e progestageni

All'inizio della gestazione il progesterone (P4) é prodotto dalle ovaie della cavalla (corpi lutei primari ed accessori).

Nei primi 100 giorni di gravidanza, questo ormone risulta indispensabile per il mantenimento della quiescenza uterina e quindi per la sopravvivenza dell'embrione, come dimostrato dagli aborti indotti dalla rimozione chirurgica delle ovaie compiuta in tale periodo (*Holtan et al. 1979*).

La produzione placentare di P4 inizia a circa 50-70 giorni, quando la placenta acquisisce il pattern enzimatico (3β -idrossisteroide-deidrogenasi) necessario alla sua sintesi (*Ginther, 1992*); con il tempo, in seguito alla cessazione dell'attività del corpo luteo a circa 150-200 giorni, la placenta diventa l'unica fonte di questo ormone (*Vaala, 2003*).

Il progesterone (P4) è presente nella circolazione periferica materna, in concentrazioni misurabili per tutto il primo trimestre di gestazione (180-220 giorni), ma successivamente la sua concentrazione non è più rilevabile poiché inferiore a 1ng/ml.

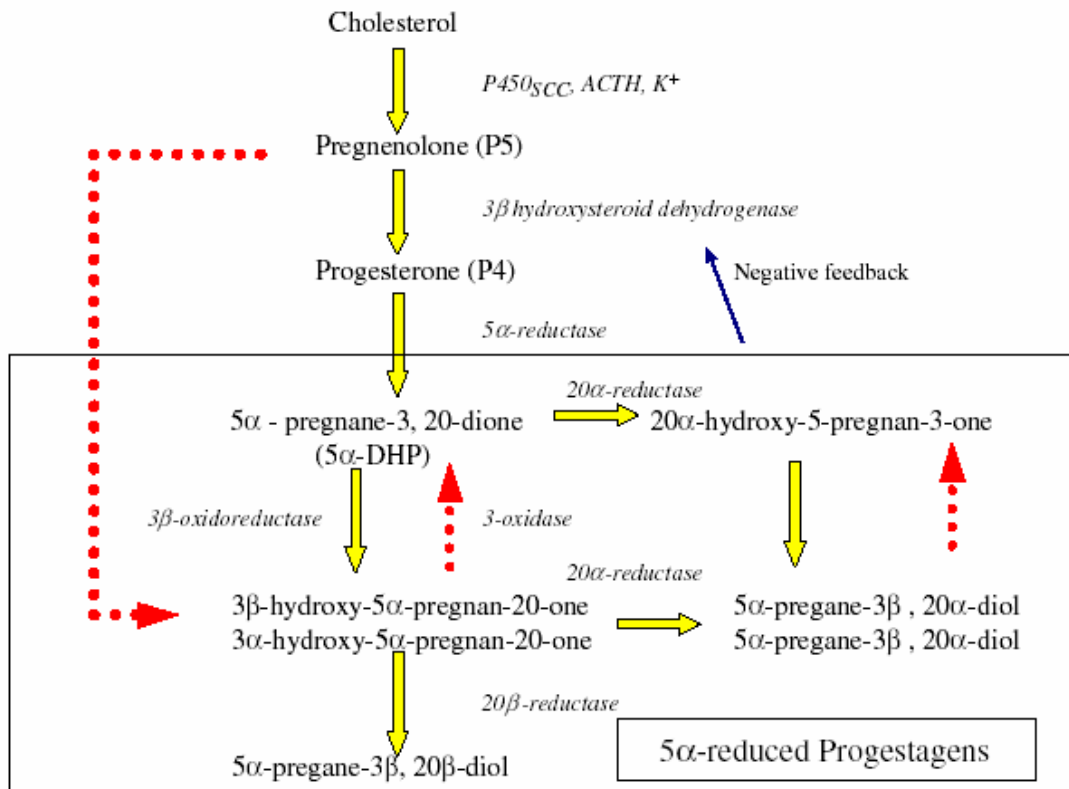
Oltre al progesterone, a livello dell'unità feto-placentare, vengono prodotti anche i suoi metaboliti (progestageni) che contribuiscono a sostenere la gravidanza dopo i 60 giorni (*Vaala, 2003*).

La concentrazione plasmatica materna dei progestageni rimane bassa fino a 15-21giorni dal termine; poi aumenta rapidamente per diminuire, altrettanto repentinamente, nelle ultime 24h che precedono il parto (*LeBlanc, 2004*).

L'incremento che si riscontra nell'ultimo mese è concomitante allo sviluppo della mammella e del suo secreto; la caduta che si verifica a 24h dal parto è invece parallela all'aumento della cortisolemia fetale (*Ousey, 2004*).

Si ipotizza che, nella seconda metà della gestazione, i progestageni siano sintetizzati dall'unità feto-placentare e dall'endometrio, a partire dal precursore pregnenolone (P5) di derivazione surrenalica fetale (*Thorburn, 1993; Silver, 1994*).

Studi in vitro hanno dimostrato che la stimolazione indotta dall'ACTH sul surrene fetale equino a termine porta alla produzione di P5 e che l'endometrio è in grado di convertire il P5 nei derivati progestageni (*Chavatte et al. 1997*).



Il pregnenolone viene infatti convertito dai tessuti utero-placentari in progesterone, 5 α -diidroprogesterone (5 α -DHP) e 20 α -idrossi-5 α -pregnan-20-one (20 α 5P).

Il P4 è riversato esclusivamente nella circolazione ombelicale, mentre il 20 α 5P e il 5 α -DHP sono immessi sia nella circolazione ombelicale che in quella uterina; quest'ultima è la via escretoria principale fino a circa 260-270

giorni di gestazione, successivamente le priorità si invertono divenendo predominante la via ombelicale (*Ousey et al. 2003*).

Il ruolo fisiologico/funzionale svolto dai progestageni non è stato ancora completamente chiarito (*Chavatte et al. 1997*); in particolare, il 5 α -diidroprogesterone (5 α -DHP) sembra giocare un ruolo determinante nel mantenere la gravidanza come suggerisce l'aumento della sua concentrazione nella tarda gestazione a livello della circolazione ombelicale (*Hamon et al. 1991; Ousey et al. 2003*).

Questa molecola sembra essere l'unica in grado di competere con il progesterone per il legame con i recettori uterini specifici, che peraltro non aumentano in modo significativo con l'avanzare della gravidanza (*P.Chavatte-Palmer et al. 2000*).

Il 5 α -DHP potrebbe quindi agire come antagonista del P4 e degli altri progestageni a livello dell'utero e, in seguito al suo incremento a termine, promuovere l'attività del miometrio rimuovendone l'azione inibitoria (miorilassante) esercitata dal progesterone.

Chavatte e collaboratori (1997) hanno ipotizzato che i progestageni possano inibire l'enzima 3 β -HSD e quindi la metabolizzazione feto-placentare del P5 nei suoi derivati; ciò sarebbe compatibile con la riduzione della concentrazione di tali ormoni a termine.

I tentativi sperimentali di indurre il parto attraverso il blocco del 3 β -HSD, hanno ottenuto l'esito atteso nella specie bovina, suina e nei primati, ma non nella cavalla; infatti nel plasma equino, fetale e materno, si ottiene una riduzione di P4 non misurabile e una riduzione dei progestageni solo transitoria (*Silver and Fowden, 1988; Schutzer et al. 1996*).

Alla luce di questi risultati, *Schutzer e Holtan (1996)* hanno suggerito un modello alternativo del metabolismo del pregnenolone, dove l'enzima chiave della sua trasformazione in 5 α -DHP e 20 α 5P sarebbe la 5 α -reduttasi.

3.3. Rapporto tra attività corticosurrenalica fetale e meccanismi di regolazione del parto.

Sebbene non sia ancora chiaro il meccanismo di interazione tra l'asse ipofisi-surrene fetale, la placenta e la concentrazione dei progestageni in prossimità del parto, si ipotizza che questi tre fattori siano strettamente legati tra loro.

L'incremento dei progestageni nel plasma materno nella tarda gestazione è probabilmente il risultato della stimolazione dell'ACTH fetale sul surrene fetale alla produzione di pregnenolone, precursore comune di P4 e progestageni (*Mason et al. 1993*).

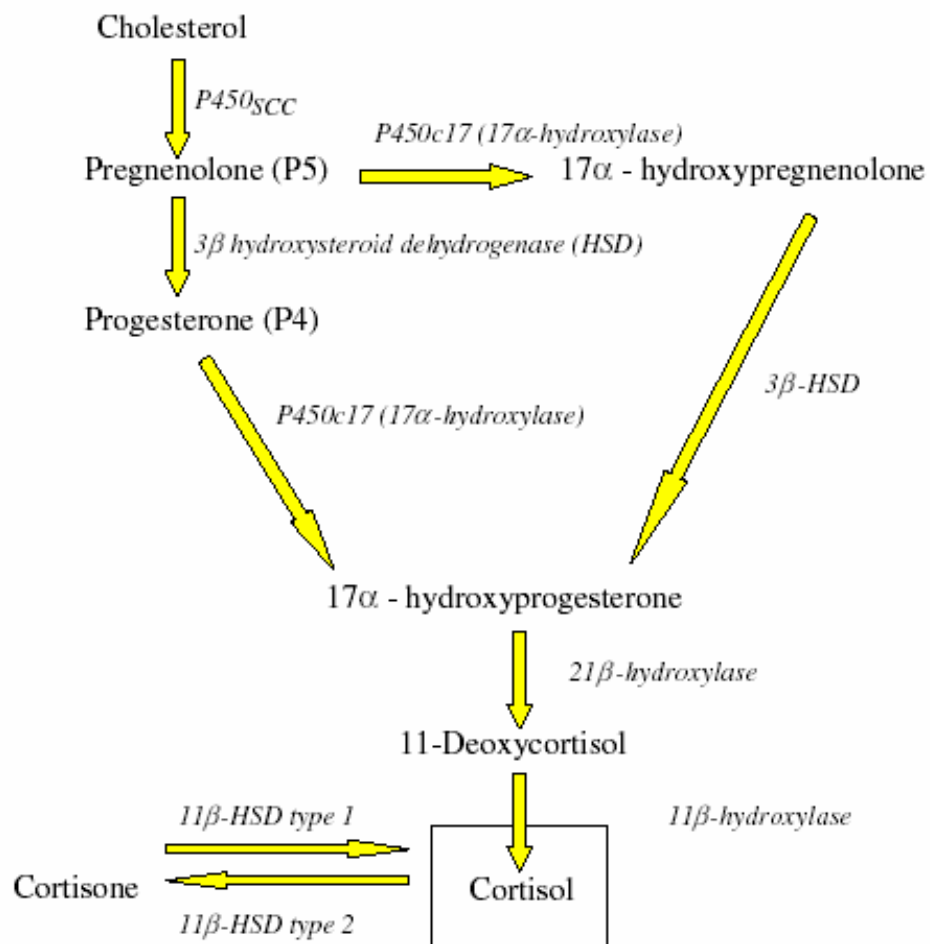


Fig. 4: Trasformazione metabolica del colesterolo in cortisolo.

Il precursore (P5) non viene convertito in cortisolo fino agli ultimi giorni che precedono il parto poiché il surrene fetale non possiede fino a quel momento l'enzima necessario per tale via metabolica (17 α -idrossilasi).

Dal momento in cui il surrene fetale comincia a produrre quantità crescenti di cortisolo, la secrezione del pregnenolone diminuisce e ciò avviene in concomitanza con la riduzione della produzione placentare dei progestageni e dei loro livelli ematici nella fattrice; pertanto questi eventi sono presumibilmente correlati (*Thorburn, 1993*).

L'incremento della cortisolemia fetale prima del parto sembra essere indipendente dalle modificazioni della cortisolemia materna e dalla concentrazione di recettori uterini per i glicocorticoidi, che rimane invariata durante la gravidanza (*Chavatte-Palmer et al. 2000*).

Per quanto concerne la cortisolemia materna, alcuni autori riportano che, in fattrici non stressate, questa rimane costante negli ultimi 10 giorni di gestazione (*Lovell et al. 1975; Silver and Fowden, 1994; Hoffmann et al. 1996*); altri invece ritengono che nelle ultime 48h prima del parto si verifichi un incremento della cortisolemia nel plasma materno parallelo a quello del feto e che quindi ci sia una sorta di sincronizzazione tra l'attività dell'ACTH materno e fetale (*Nathanielsz et al. 1975; Fleeger et al. 1979; Cudd et al. 1995*).

Probabilmente durante tutta la gestazione c'è un piccolo trasferimento transplacentare di cortisolo, poiché la placenta possiede l'enzima, 11 β -idrossido deidrogenasi (11 β -HSD), necessario alla conversione del cortisolo (biologicamente attivo) nel metabolita cortisone inattivo (*Nathanielsz et al. 1975; Chavatte et al. 1995*).

Questo enzima è presente in due isoforme, tipo 1 e tipo 2, le cui proporzioni non sono state ancora quantificate nella placenta equina.

Il tipo1 catalizza la trasformazione del cortisone in cortisolo; il tipo 2 è responsabile dell'inattivazione del cortisolo, probabilmente per proteggere il feto da una precoce ed eccessiva esposizione ai glicocorticoidi materni, che in alcune specie si è dimostrata dannosa ai fini dell'accrescimento intrauterino. Nella placenta della donna, infatti, una carenza dell'attività enzimatica di tipo 2 è associata ad un basso peso alla nascita e a gravi alterazioni fetali (*Kajantie et al. 2003*).

Gli effetti generati da un eccesso di glicocorticoidi (endogeni o esogeni) sulla cortisolemia fetale equina sono ancora sconosciuti, ma si ritiene che causino una riduzione della concentrazione dei progestageni ed il conseguente aborto (*van Niekerk and Morgenthal, 1982; Santschi et al. 1991*).

Al contrario *Ousey e collaboratori (2000b)* hanno osservato che aumenti sostenuti del cortisolo plasmatico materno, in seguito a trattamenti ripetuti con ACTH esogeno, inducono un incremento della concentrazione dei progestageni e parti prematuri di puledri vitali.

Probabilmente la stimolazione cronica dell'asse endocrino fetale induce un'accelerata maturazione dei sistemi organici fetali, come dimostrato da studi svolti in casi di placentite cronica su cavalle in avanzato stato di gravidanza (*LeBlanc, 2004*).

4. RUOLO DEI GLICOCORTICOIDI NELLA MATURAZIONE DI ALCUNI SISTEMI ORGANICI

La maggior parte dei processi maturativi organici sono dipendenti dai glicocorticoidi e possono essere prematuramente indotti dalla loro somministrazione esogena (*Silver, 1990; Liggins, 1994; Fowden, 1995*).

In donne che presentano gravidanze a rischio di parto prematuro è pratica comune il trattamento con glicocorticoidi per aumentare le probabilità di sopravvivenza del neonato (*NIH Consensus Development Conference, 1995*).

Nella maggior parte delle specie la concentrazione di glicocorticoidi aumenta nella tarda gestazione, ma il momento e la quantità secreta differiscono a seconda della specie.

Come già riferito, nel feto equino tale incremento si verifica solo negli ultimissimi giorni che precedono il parto. Inoltre a differenza di quanto avviene in altri mammiferi, nel feto equino l'aumento della cortisolemia e del suo effetto è legato ad una contemporanea riduzione della concentrazione plasmatica della CBG (*Challis et al. 1993; Wood and Cudd, 1997*).

Per quanto riguarda il ruolo svolto dai glicocorticoidi nel promuovere la maturazione degli apparati organici molte informazioni possono solo essere presumibilmente estrapolate da altre specie su cui sono stati svolti studi in merito (*Fowden et al. 1998*).

4.1. Polmone

Nella pecora, il cortisolo promuove la maturazione funzionale del polmone: accelerando lo sviluppo alveolare, riducendo lo spessore dei setti interalveolari, incrementando il contenuto di collagene ed elastina (*Crone et al. 1983; Schellenberg et al. 1987; Warburton et al. 1988*).

I glicocorticoidi preparano il polmone all'espansione e alla dinamica della respirazione stimolando la sintesi delle componenti proteiche e lipidiche del surfattante e il suo rilascio negli alveoli (*Kitterman, 1981*) e favorendo il riassorbimento dei liquidi in eccesso (*Wallace et al. 1995*) attraverso l'incremento dei β -recettori che attivano i canali ionici dell'epitelio alveolare (*Warburton et al. 1988; Ingbar et al. 1997*).

4.2.Fegato

Il cortisolo promuove la sintesi di un'ampia varietà di proteine compresi enzimi, recettori, proteine di legame e fattori di crescita.

Nel feto equino, come in altre specie, è stato messo in evidenza che, parallelamente all'incremento della cortisolemia a termine, viene accelerato il deposito di glicogeno a livello epatico, muscolare, cardiaco e viene stimolata la gluconeogenesi nel fegato e nel rene grazie all'attivazione enzimatica (glucosio-6-fosfatasi) e all'effetto permissivo sulle catecolamine (stimolazione dei β -recettori adrenergici epatici) (*Fowden et al. 1991, 1993, 1995*).

Pertanto l'aumento della cortisolemia in prossimità del parto sembra giocare un ruolo chiave nell'assicurare adeguate riserve energetiche alla nascita e nel promuoverne la mobilitazione subito dopo il parto.

Nel feto di pecora è stato riscontrato che gli effetti maturativi indotti dal cortisolo sul fegato regolano la funzionalità di molti altri sistemi endocrini: deiodazione dell'anello esterno della tiroxina (T4) in triiodotironina (T3) biologicamente attiva ed essenziale per la termogenesi post-natale; up-regulation dei recettori per l'ormone somatotropo (GH) e per la prolattina e dei β -recettori adrenergici (*Li et al. 1996b; Barnes, 1997*).

4.3.Apparato gastroenterico

L'azione dei glicocorticoidi a questo livello è sia di tipo strutturale che funzionale.

Nel feto di suino e di pecora è stato ipotizzato che le modificazioni strutturali e funzionali che si verificano nelle diverse porzioni dell'apparato

gastroenterico nella gravidanza a termine siano dipendenti dall'incremento della cortisolemia .

Inoltre, sempre in queste specie, è stato osservato che gli effetti maturativi indotti dal cortisolo procedono in senso prossimo distale, con un'azione predominante a livello gastrico (sviluppo dei villi e delle cripte, stimolazione della secrezione acida e di gastrina...) e nell'intestino prossimale (crescita in altezza e densità dei villi, assottigliamento della muscolaris mucosae...), ma che il cortisolo promuove la sintesi di enzimi digestivi a tutti i livelli (*Trahair et al. 1987b; Trahair and Sangild, 1997*).

Per quanto riguarda il puledro, l'elevata esposizione ad ormoni surrenalici è stata messa in relazione al rapido turn-over cellulare con cui le cellule epiteliali intestinali, specializzate nell'assorbimento degli anticorpi colostrali, vengono sostituite

(*Riggs, 1987*; <http://www.bioinfovet.unimi.it/cavallo/imunol.html>).

4.4.Pressione ematica e frequenza cardiaca: correlazione tra cortisolo e sist. renina-angiotensina

Il sistema renina angiotensina sembra essere coinvolto direttamente nel mantenimento della pressione sanguigna e del volume di fluidi nel compartimento extra-cellulare durante la gravidanza; inoltre sembra possedere un'azione permissiva e protettiva nei confronti di molte alterazioni neonatali a carico dell'apparato cardiovascolare.

In uno studio eseguito mediante la cateterizzazione di feti di pony durante la seconda metà della gestazione (156-336 giorni), è stata valutata la relazione esistente tra pressione sanguigna, frequenza cardiaca e concentrazione plasmatica di cortisolo. In particolare, per valutare l'andamento della pressione fetale sono state misurate tutte le componenti circolanti del sistema

renina-angiotensina: renina, angiotensinogeno, enzima angiotensina-convertente (ACE) e angiotensina II.

Da questo studio è emerso che la pressione ematica nel feto equino aumenta progressivamente con l'avanzare della gestazione e in prossimità del parto subisce un ulteriore incremento che coincide con quello della cortisolemia e della concentrazione dell'ACE (*Forhead et al. 2000*).

Contrariamente a quanto avviene nel cavallo adulto, dove l'enzima angiotensina-convertente è soprattutto sintetizzato a livello polmonare, la principale fonte di ACE nel feto sembra essere la placenta per la maggior parte della gestazione (*Raimbach and Thomas, 1990*); di conseguenza i polmoni fetali devono acquisire la capacità di sintetizzarla prima della nascita al fine di raggiungere una completa funzionalità del sistema renina-angiotensina essenziale per la vita post-natale.

L'incremento della concentrazione plasmatica fetale dell'ACE osservato nei ponies e in altre specie potrebbe essere quindi dovuto al meccanismo di up-regulation recettoriale indotto dall'incremento della sintesi dell'enzima a livello polmonare in preparazione alla vita extra-uterina.

I glicocorticoidi promuovono la sintesi e l'attività dell'ACE nelle cellule endoteliali polmonari dell'adulto (*Mendelsohn et al. 1982; Fishel et al. 1995*) e sono essenziali per le modificazioni funzionali e strutturali che avvengono nel polmone fetale, favorendo fra l'altro, mediante l'attivazione degli enzimi necessari per la sintesi di adrenalina, il riassorbimento di liquido polmonare fetale al momento del parto (*Warburton et al. 1988; Wallace et al. 1995*); inoltre la somministrazione di cortisolo esogeno a feti immaturi di pecora prima del fisiologico incremento della cortisolemia endogena a termine, determina un incremento della pressione ematica fino ai valori fisiologici riscontrati in prossimità del parto (*Forhead and Fowden, 1998*) e questo

effetto ipertensivo è associato all'aumento delle concentrazioni di angiotensina e renina circolanti (*Forhead et al. 1998a*).

Queste osservazioni suggeriscono che, nel feto equino, sia l'incremento della cortisolemia prima del parto l'elemento chiave nell'induzione enzimatica del sistema renina-angiotensina e del conseguente effetto ipertensivo, confermando il ruolo fondamentale dei glicocorticoidi nel promuovere la differenziazione e maturazione dei tessuti.

Il sistema renina-angiotensina sembra inoltre essere coinvolto nel controllo della frequenza cardiaca, che contrariamente alla pressione ematica, risulta inversamente proporzionale all'età della gestazione e non sembra essere influenzata direttamente dall'incremento della cortisolemia a termine (*Forhead, 2000*).

5. ADATTAMENTO ALLA VITA E SUO RUOLO COME EVENTO STRESSOGENO

(*Knottenbelt, Holdstock, Madigan, 2004*)

5.1. Adattamento alla vita extra-uterina

Il passaggio dal protetto ambiente uterino dove i fabbisogni del feto sono tutti pienamente soddisfatti dalla madre, attraverso l'unità utero-placentare, a quello esterno in cui il puledro dovrà essere autonomo per la maggior parte delle sue esigenze, rappresenta una delle fasi più critiche e stressanti della vita del neonato.

Il periodo di adattamento coinvolge tutti i sistemi organici del feto/puledro sebbene con tempistiche e priorità diverse a seconda delle caratteristiche

peculiari della specie e del livello di maturità raggiunto nel periodo che precede il parto. Tali modificazioni nel feto equino evolvono precipitosamente in un range di tempo molto breve e prossimo al parto.

Le esigenze post-natali (il passaggio alla respirazione polmonare, un'adeguata capacità di termoregolazione, il raggiungimento della stazione quadrupedale per potersi attaccare alla mammella e successivamente seguire la madre, etc...) sono immediate e comportano un enorme dispendio energetico-metabolico richiedendo al puledro una risposta adattativa rapida e mutevole.

Il neonato equino pertanto deve essere considerato un individuo distinto e non un soggetto adulto di 50kg poiché in questa fase critica i parametri di funzionalità organica sono molto più delicati e variabili.

5.1.1. Adattamento respiratorio

Alla nascita una piena funzionalità del sistema di ventilazione è di vitale importanza per la sopravvivenza del neonato e il primo atto respiratorio deve avvenire entro 3 minuti dall'espulsione perché non venga compromessa l'ossigenazione dei tessuti.

Nella dinamica della ventilazione polmonare intervengono numerosi fattori strettamente interdipendenti: la produzione del surfattante che permette ai polmoni di espandersi e di trattenere aria e che è prodotto dal feto solo nelle ultime settimane di gestazione; il passaggio attraverso il canale del parto che determina una compressione sul torace che favorisce la fuoriuscita dei liquidi in eccesso dalle vie aeree; gli stimoli endogeni (ipossia, acidosi respiratoria ed ipercapnia transitorie) ed esogeni (bassa temperatura dell'ambiente, stimolazione tattile ed effetto della gravità) che determinano lo sforzo respiratorio a glottide chiusa necessario per il primo atto respiratorio; l'assunzione immediata della posizione sternale che favorisce l'ossigenazione del sangue incrementandone la pressione parziale a livello arterioso.

I corticosteroidi, gli ormoni tiroidei, e gli agonisti β -adrenergici svolgono durante la gravidanza e in prossimità del parto un ruolo determinante nel preparare il polmone all'espansione promuovendo tra l'altro l'assottigliamento delle cellule alveolari così da favorire, al momento della nascita, il passaggio dell'ossigeno attraverso la barriera alveolo capillare.

La frequenza respiratoria nell'immediato post-parto può raggiungere i 75 atti respiratori al minuto (arm), ma già dopo le prime ore diminuisce (35-40arm), stabilizzandosi tra i 20-40arm nella prima settimana; in questa fase, la frequenza respiratoria è comunque più elevata rispetto agli adulti (8-12arm).

Alcuni eventi stressogeni possono determinare un incremento della frequenza respiratoria: shock, setticemia, problemi al sistema nervoso centrale e febbre (*Koterba, 1990; Vaala, 1994*).

5.1.2. Adattamento cardiocircolatorio

Durante la gravidanza la presenza del dotto arterioso, unitamente ad una pressione relativamente ridotta in aorta e all'elevata resistenza offerta dal polmone ancora collassato, permettono al sangue di bypassare il circolo polmonare nell'aorta; di conseguenza il sangue che arriva ai distretti periferici risulta solo parzialmente ossigenato. In molte specie questo deficit è compensato da una maggior affinità dell'emoglobina fetale per l'ossigeno; in realtà sembra che l'emoglobina del puledro neonato abbia una struttura identica a quella dell'adulto (*Bunn and Kitchen, 1973*).

Comunque, il sangue ossigenato materno passa, tramite la placenta, nella vena cava e da qui, attraverso il forame ovale, nell'atrio sinistro garantendo un adeguato apporto di ossigeno all'encefalo.

Dopo la nascita, in seguito all'espansione dei polmoni, si ha una riduzione della pressione a livello dell'arteria polmonare ed un richiamo ematico nell'aorta.

L'arrivo di sangue ossigenato determina la vasocostrizione del dotto arterioso che in genere si chiude fisiologicamente a 24h dalla nascita; la chiusura anatomica del dotto arterioso può tuttavia avvenire lentamente nell'arco di alcuni giorni, risultandone un murmure sistolico udibile in corrispondenza della base cardiaca.

Gli eventi che determineranno la chiusura del dotto arterioso dopo la nascita sembrano essere programmati già alcuni giorni prima del parto in rapporto all'incremento della concentrazione plasmatica dei corticosteroidi (*Liggins and Kitterman, 1981*).

Dopo la nascita anche la presenza del forame ovale tra atrio destro e sinistro non è più necessaria e la sua chiusura è indotta dall'aumento della pressione nel cuore sinistro e dalla riduzione della pressione nel cuore destro.

Nei primi minuti dopo la nascita la frequenza cardiaca del puledro si aggira intorno ai 50-60 battiti al minuto (bpm), ma in seguito aumenta rapidamente fino ad oltre i 120bpm per stabilizzarsi intorno agli 80bpm durante la prima settimana di vita.

5.1.3. Termoregolazione

Tutti i neonati nascono “bagnati” dai liquidi provenienti dalla rottura degli invogli fetali e anche in condizioni ottimali di ricovero nel box, alla nascita, sono comunque sottoposti ad uno shock termico compensato in un primo momento solo dallo sforzo muscolare associato al parto.

I tremori sono uno dei mezzi principali con cui il puledro può termoregolarsi; tuttavia la produzione di calore è un processo che richiede notevole dispendio energetico e l'unica risorsa cui il neonato può attingere, prima dell'allattamento, è la mobilitazione di grassi e zuccheri dai depositi (glicogeno epatico e muscolare e tessuto adiposo bruno).

Per quanto concerne le riserve di grasso bruno, nel puledro non è stata dimostrata la presenza di alcun deposito di questo tipo.

Quindi, la sopravvivenza del puledro, anche in condizioni di temperatura molto sfavorevoli, dipende dal rapido ed efficace adattamento di tutti i suoi sistemi organici e dalla precoce capacità di allattarsi.

Puledri sani sono in grado di mantenere la temperatura corporea a valori adeguati e costanti (37-39°C), senza alimentarsi, per 12-24h; ma, se le riserve energetiche sono scarse o la richiesta metabolica è maggiore (puledri dismaturi/prematuri), la temperatura può scendere in modo critico al di sotto dei 37°C fino a determinare uno stato di shock..

Anche l'ipertermia può avere notevoli ripercussioni e temperature al di sopra dei 40°C possono causare convulsioni e coma.

Infine, in certi casi i puledri sono incapaci di termoregolarsi nonostante alla nascita si presentino normali (*Fenger, 1998*).

5.1.4. Locomozione

Il puledro neonato deve assumere rapidamente la stazione quadrupedale e muoversi con sicurezza già nelle prime ore dopo la nascita.

Ciò implica che muscoli ed ossa siano ben sviluppati e che il sistema nervoso sia pienamente efficiente per permettere l'adattamento alle nuove posture e la coordinazione dei movimenti.

Sebbene il puledro cerchi di alzarsi già dopo circa 15 minuti dalla nascita, normalmente la stazione quadrupedale viene raggiunta nell'arco di 1-2h, permettendogli di arrivare alla mammella ed alimentarsi; dopo 2-4h il neonato dovrebbe essere in grado di compiere rapidi movimenti.

Nell'ultimo periodo di gravidanza, l'impossibilità di muoversi nel ventre materno conseguente all'accrescimento fetale e alla riduzione dello spazio in utero, può predisporre alcuni puledri con arti particolarmente lunghi, ad

anomalie/asincronie di crescita scheletrica e muscolo-tendinea; tuttavia di solito gli adattamenti posturali e motori dopo la nascita sono molto rapidi e anche alcune lievi anomalie (lassità tendinea e legamentosa) si risolvono nell'arco di pochi giorni.

5.1.5. Funzione nervosa

I puledri non sono in grado di rispondere a stimoli nervosi finché sono impegnati nel canale del parto, ma possono reagire a stimoli nocivi come una lieve pressione sulle palpebre o il pizzicamento degli zoccoli (segni che, in caso di distocia, possono indicare se il neonato sia ancora vivo).

I riflessi di raddrizzamento sono attivi subito dopo l'espulsione e normalmente il puledro assume entro pochi minuti la posizione sternale che favorisce la ventilazione polmonare.

Dopo pochi minuti (5-10min) sono inoltre apprezzabili il riflesso di suzione, essenziale per l'allattamento, il riflesso di sollevamento della testa e i primi tentativi di alzarsi; una volta raggiunta la stazione quadrupedale (1-2h) il puledro tende ad assumere un'ampia base di appoggio e appare scoordinato.

L'andatura è inizialmente ipermetrica ed esageratamente marcata, indice di un'iperiflessia generale.

In questa fase, anche le risposte a stimoli uditivi e tattili risultano eccessive.

Se non ci sono problemi, entro 2-3h il puledro si muove in modo sicuro e coordinato e può raggiungere agevolmente la mammella materna.

Per quanto riguarda la vista, i puledri possono nascere ciechi e la normale capacità visiva si sviluppa di solito nell'arco di 1-2giorni.

Il riflesso pupillare è presente dalla nascita mentre il riflesso palpebrale e la risposta di minaccia sono generalmente deboli. La reazione di minaccia si stabilizza in alcuni giorni e non deve essere erroneamente scambiata per cecità.

Il raggiungimento di una piena funzionalità nervosa, sensitiva e cognitiva istintuale, riveste per il puledro un ruolo supplementare determinante ai fini del riconoscimento dell'ambiente e soprattutto della madre (*Rossdale, 1967*).

Quest'ultimo deve avvenire entro pochi minuti dal parto e si rende manifesto quando il neonato comincia a rispondere alle vocalizzazioni materne.

La mancanza dell'imprinting iniziale può compromettere la sopravvivenza del puledro, poiché madri che non lo abbiano riconosciuto ed accettato come proprio, evenienza che si verifica più frequentemente nelle primipare, possono anche reagire in modo aggressivo ed impedire che si avvicini alla mammella per allattarsi.

5.1.6. Adattamento gastroenterico

L'apparato gastroenterico si sviluppa durante la vita fetale ma la piena efficienza digestiva si ha solo dopo la nascita in seguito all'assunzione prima del colostro e successivamente del latte materno.

Il transito del colostro nell'intestino induce il rilascio di ormoni, neuropeptidi ed enzimi ad effetto trofico e attiva le cellule specializzate nell'assorbimento, per pinocitosi, degli anticorpi in esso contenuti.

La capacità di assorbire gli anticorpi colostrali è limitata nel tempo (è massima nelle prime 8h dal parto), poiché dopo 24-48h si completa la sostituzione degli strati epiteliali specializzati superficiali con le cellule degli strati più profondi in attiva proliferazione.

Il colostro possiede anche un effetto lassativo che favorisce, insieme alla stimolazione indotta dal "grooming" perineale materno, l'espulsione del meconio.

Questo materiale è costituito dai residui del liquido amniotico inghiottiti dal feto, da cellule di sfaldamento dell'epitelio intestinale e dalle normali secrezioni biliari ed intestinali prodotte dal feto durante la gravidanza.

Il meconio ha una forma simile a piccole scibale, ha un colore marrone scuro/nerastro e una consistenza molto appiccicosa; al contrario il materiale fecale prodotto in seguito alla digestione del latte è informe, ha una consistenza molle/pastosa e un colorito giallastro.

Il passaggio del meconio avviene in breve tempo (2-3h dal parto) e l'espulsione si completa nell'arco di 24h dalla nascita.

I borborigmi intestinali nel puledro sono simili a quelli dell'adulto e possono essere auscultati, ogni 10-20sec in tutti e quattro i quadranti addominali.

5.1.7. Funzione renale

Durante la gravidanza, l'urina prodotta dal feto viene escreta in vescica e da qui attraverso l'uraco, nel sacco allantoideo.

Alla nascita l'uraco si rompe con il cordone ombelicale e successivamente regredisce, trasformandosi nel legamento mediano della vescica.

Nel puledro neonato, il rene non è ancora funzionalmente maturo e, nonostante le elevate concentrazioni plasmatiche di renina ed aldosterone, ha una capacità di concentrare le urine molto meno efficiente rispetto all'adulto, a prescindere dallo stato di idratazione (fisiologico o patologico); pertanto il volume di urina prodotto dal puledro nelle prime 24-48h è elevato così come elevata risulta l'escrezione urinaria di elettroliti (Na^+ , K^+ , Cl^-); mentre il suo peso specifico è normalmente basso.

La maturazione funzionale del rene si completa normalmente dopo 48h, ma può richiedere tempi maggiori in puledri dismaturi/prematuri.

5.1.8. Concentrazione ematica di glucosio

In puledri sani, la concentrazione ematica di glucosio alla nascita è ca. 3-3,5mmol/L e nelle prime 24h aumenta oltre i 4,5-6mmol/L.

La glicemia è principalmente regolata dall'azione dell'insulina e del glucagone.

Alla nascita, le cellule β -pancreatiche sono funzionanti e la variazione della glicemia sembra essere, già in utero, il principale modulatore della loro secrezione (*Fowden and Silver, 1984*).

Anche le catecolamine endogene e i corticosteroidi intervengono nella regolazione della glicemia: le prime attraverso una potente azione glicogenolitica; i secondi favorendo la gluconeogenesi e l'accumulo di glicogeno epatico.

Grazie a questi depositi, il puledro è normalmente in grado di mantenere la glicemia a valori costanti, in assenza dell'integrazione di carboidrati (lattosio) legata all'allattamento, per almeno 2h dopo il parto.

Tuttavia, alla nascita, nel puledro la quota di enzimi gluconeogenetici di fegato e rene è scarsa e la completa maturazione funzionale propria del cavallo adulto viene raggiunta solamente circa un mese dopo il parto (*Fowden et al. 1992*).

5.1.9. Asse ipofisi-surrene

La corticale del surrene fetale equino sembra essere relativamente quiescente fino a 3-4 giorni dal parto e in questo breve lasso di tempo, si verifica una rapida escalation dei livelli di cortisolo circolante (*Silver et al. 1994*).

Nei puledri nati a termine, il valore della cortisolemia alla nascita è ca. 7-8mcg/dl; durante la prima ora di vita i valori aumentano repentinamente fino ad un picco massimo di 12-14mcg/dl e successivamente scendono a 6mcg/dl in circa 6h, per stabilizzarsi a valori basali di ca. 3mcg/dl nei tre giorni successivi al parto.

La concentrazione plasmatica di ACTH risulta elevata alla nascita (ca. 300pg/ml) e cala repentinamente nei successivi 15-60min, parallelamente

all'incremento della cortisolemia, per stabilizzarsi nelle successive 24-48h a valori basali ($\leq 35\text{pg/ml}$ secondo *Perkins et al. 2002*)

Puledri prematuri presentano invece valori di cortisolemia nettamente inferiori, ma ciò non stupisce visto il ruolo fondamentale di questo ormone nel pilotare la maturazione del feto e la sua “prontezza a nascere” (*Silver et al. 1984, 1991; Shaftoe, 1990*).

5.1.10. Catecolamine

La concentrazione plasmatica di adrenalina e noradrenalina dopo la nascita è molto variabile e strettamente dipendente dal livello di stress, che può aumentare anche semplicemente come conseguenza delle manualità praticate per effettuare il prelievo.

Una corretta stima dei livelli ematici risulta pertanto difficoltosa (emivita di appena 3 min per l'adrenalina, ancora inferiore per la noradrenalina) e di scarsa utilità.

Quello che risulta più interessante è il rapporto inverso tra la concentrazione delle catecolamine e il valore del pH; puledri stressati possono infatti rapidamente andare incontro ad acidosi.

5.1.11. Funzione tiroidea

Nel puledro gli ormoni tiroidei (T4-T3), alla nascita, sono presenti in concentrazioni ematiche particolarmente elevate rispetto ai valori riscontrati nei neonati di altre specie (*Chen and Riley, 1981*) e di 10-20 volte superiori a quelle del cavallo adulto.

Nelle prime settimane dopo la nascita la concentrazione di T4 (inattivo) si riduce in favore di una continua crescita di T3 (biologicamente attivo), per stabilizzarsi a valori basali nell'arco di circa un mese.

L'elevata concentrazione alla nascita di questi fattori e il loro rapido incremento dopo il parto sembrano essere fortemente influenzati dall'attività corticosurrenalica a termine, in particolare dall'aumento della cortisolemia (*Silver et al. 1991*).

Nel feto di pecora, è stata infatti evidenziata un'implicazione diretta del cortisolo nella conversione del T4 in T3 (*Nathanielsz et al. 2003*); sempre in questa specie è stato visto che l'asportazione chirurgica delle surreni impedisce che si verifichi l'aumento di T4 e T3 in prossimità del parto (*Wallace et al. 1996*).

Anche altri meccanismi sembrano essere coinvolti nell'incremento degli ormoni tiroidei dopo il parto: la rottura del cordone ombelicale, con interruzione del rapporto placentare ed aumento improvviso della tensione di ossigeno, e lo stimolo alla termogenesi indotto dalla minore temperatura esterna (*Sack et al. 1976*).

In puledri prematuri, basse concentrazioni ematiche di T3 alla nascita sono infatti associate ad una insufficiente termoregolazione e mobilitazione delle riserve energetiche; in questi soggetti, tali problemi sono aggravati dalla ridotta capacità di movimento e di allattamento (*Silver et al. 1991*).

Gli ormoni tiroidei sono implicati nel corretto sviluppo muscolo-scheletrico, nervoso e comportamentale (per esempio: mielinizzazione delle fibre nervose e coordinazione neuromuscolare) (*Irvine and Evans, 1975*).

Pertanto, una ridotta funzionalità tiroidea fetale comporta una diminuzione del metabolismo basale e della differenziazione cellulare con ripercussioni: sul feto, ritardandone l'accrescimento; sul momento del parto, alterandone le tempistiche; e sul puledro neonato che manifesterà, in caso di ipotiroidismo grave ("thyroid musculoskeletal disease"), debolezza muscolare, alterazioni muscolo-scheletriche (contratture tendinee, artrogrifosi, deformità angolari degli arti, prognatismo mandibolare, etc...), e segni di immaturità (pelo corto

e setoso, lassità dei legamenti articolari e padiglioni auricolari morbidi e flessibili) (*Allen et al. 1993, 1994; Card and Manning, 2000*).

6. CONCETTO DI PREMATURITA'/DISMATURITA'

L'im maturità rappresenta una problematica molto complessa per il clinico veterinario che dovrebbe prima di tutto essere in grado di stabilire quali siano le concrete chance di sopravvivenza del neonato in relazione anche alle aspettative del proprietario e al futuro utilizzo che questi intende farne (animale da affezione o cavallo sportivo?).

Spesso le complicazioni cliniche che insorgono coinvolgono più apparati organici (muscolo-scheletrico, respiratorio e gastroenterico) e il clinico dovrà affrontarle secondo un preciso ordine di priorità da stabilirsi in modo diverso in base al caso specifico.

Diversi parametri devono essere presi in considerazione per poter stabilire il livello di maturità del puledro alla nascita.

Il primo criterio con cui viene stabilito il livello di maturità alla nascita riguarda la durata della gestazione.

Questo parametro è molto variabile nella specie equina in quanto la gestazione della cavalla può essere fisiologicamente compresa tra 320-345 giorni in base a differenze di razza e individuali che tra l'altro tendono a ripresentarsi e a "fissarsi" in parti successivi.

Per esempio la lunghezza media della gestazione riportata per i purosangue è di 340-342 giorni (*Rossdale and Short, 1967; Ropiha et al. 1969; Hintz et al. 1979; Campitelli, Carenzi, Verga, 1982; Rossdale, 1993*), ma uno studio condotto a NewMarket, Inghilterra, riporta che il 95% delle

fattrici purosangue hanno partorito tra i 327-357 giorni (*Rossdale and Short, 1967*); uno studio canadese della durata di 18 anni riporta una variabilità di gestazione tra 305-365 giorni (*Hintz et al, 1979*); uno studio australiano, 315-387 giorni (*Ropila et al, 1969*) e uno studio giapponese addirittura 286-370 giorni (*Sato et al. 1973*).

Altri fattori sembrano inoltre incidere sulla durata della gestazione. Si riporta infatti una variabilità in rapporto al sesso del puledro con una differenza di ca. 1,5-2,5 giorni tra maschi e femmine (*Sevinga et al. 2004*); i maschi avrebbero una placenta più pesante alla nascita e necessiterebbero di un tempo maggiore per raggiungere la stazione quadrupedale (*Campitelli, Carenzi, Verga, 1982*). Riguardo all'influenza materna e paterna sulla durata della gestazione i pareri sono ancora discordanti, mentre è accertato che la presenza di gemelli determini un accorciamento della gravidanza e un ritardato accrescimento fetale in utero (*Jeffcott and Whitwell, 1973*).

A prescindere da questa ampia varietà di aspetti, è opportuno tener presente che la durata della gestazione non è un indice che da solo può permettere di stabilire il livello di maturità del puledro alla nascita, poiché ci sono puledri che risultano immaturi pur essendo nati nel range di durata “normale” o puledri che si presentano immaturi pur avendo trascorso in utero un periodo superiore al previsto; pertanto la durata della gravidanza è un dato sicuramente importante che tuttavia non deve essere scorporato dal contesto, ovvero dai dati clinici, fisiologici o patologici, che il puledro manifesta alla nascita.

6.1. Definizioni

In base alla letteratura in merito, si definisce *premature* un puledro nato prima dei 320 giorni di gestazione; tale valore è stato definito sulla base di studi che hanno riguardato i parametri di peso corporeo e vitalità che nei soggetti nati prima di tale periodo sono risultati non sufficienti a garantire il loro corretto sviluppo (Rossdale, 1993; Koterba, 1993).

Questi soggetti hanno una probabilità di sopravvivenza del 70-75% (Leadon, Jeffcott and Rossdale, 1986).

Puledri nati prima dei 300 giorni di gestazione generalmente non sopravvivono (Shideler, 1993).

Si parla invece di *dismaturità* sia quando il puledro è nato fisiologicamente a termine (320-345 giorni), ma mostra comunque segni di prematurità e di scarso accrescimento, sia quando la durata della gestazione abbia superato i 350 giorni.

Sebbene i termini *premature* e *dismature* si riferiscano a limiti diversi di durata della gestazione, in realtà da un punto di vista clinico queste due condizioni hanno caratteristiche simili; per questo motivo sono state proposte le seguenti definizioni: “*readiness*”/“*unreadiness for birth*” (Rossdale and Silver, 1984), per descrivere puledri che non abbiano raggiunto alla nascita un completo livello di maturazione dei sistemi organici, per insufficiente sviluppo dell’asse ipofisi-surrene fetale e “*vitali/non vitali*”, in relazione alle loro chance di sopravvivenza (Koterba, 1993).

Quest’ultima definizione prescinde dalle considerazioni a carattere economico relative sia al valore del puledro che alle possibilità che il proprietario ha di investire sulle eventuali cure.

A partire dal concetto di “prontezza a nascere”, Rossdale (1993) ha infine introdotto la definizione di “*twilight foal*”, per descrivere quei puledri che

alla nascita mostrano uno sviluppo dell'asse ipofisi-surrene accelerato ma incompleto (*Silver et al. 1991*).

6.2.Segni clinici

La condizione di prematurità/dismaturità del puledro alla nascita comprende le seguenti caratteristiche clinico-patologiche (*Holdstock, 2005*):

- basso peso e dimensione (in confronto alla taglia della razza);
- peluria corta, setosa e lucente;
- fronte prominente e arrotondata; caratteristica da distinguere da quella propria dei puledri di razza Arabo e Pony del Galles;
- scarsi o assenti riflessi di raddrizzamento e suzione;
- ottundimento del sensorio;
- padiglioni auricolari e muso morbidi e flessibili;
- lingua di colore rosso/arancio (normalmente è rosa chiaro) e mucose pallide, spesso in associazione ad uno stato anemico;
- disidratazione ed emaciazione; a volte conseguente a diarrea, ma più spesso legata a gravi disordini metabolici a carico delle ghiandole surrenali e del rene;
- bassa temperatura rettale;
- lassità periarticolare e scarso sviluppo muscolare; questa caratteristica si accompagna ad una difficoltà a raggiungere e mantenere la stazione quadrupedale (la mancata coordinazione dei movimenti può indicare disfunzioni nervose);
- scarsa o mancata ossificazione che può portare, nei casi più gravi, a collasso delle ossa carpali e tarsiche accompagnate da deformità angolari e flessorie;

- frequenza respiratoria ridotta ed anomalie del carattere del respiro; soprattutto la bassa frequenza respiratoria rappresenta un indice prognostico sfavorevole poiché, a fronte di una scarsa ossigenazione, il controllo nervoso dei centri respiratori può divenire inefficace;
- scarso adattamento nervoso con progressiva perdita del riconoscimento ambientale e materno, conseguente alla ridotta ossigenazione cerebrale; in tal caso i puledri possono essere o diventare cechi.

Al contrario puledri che abbiano trascorso in utero un tempo superiore alla “norma” (>350 giorni di gestazione) mostrano un peso accettabile alla nascita, una buona struttura ossea ma uno scarso sviluppo muscolare; ciò conferisce loro un aspetto “allampanato”.

A differenza dei prematuri è più frequente la comparsa di contratture dei legamenti del nodello piuttosto che la loro lassità e, a seconda del tempo in più trascorso in utero, possono nascere già con pelo lungo ed eruzione dei denti incisivi (normalmente questa avviene a circa 5-7 giorni dalla nascita) (*Guy D. Lester, BVMS, PHD, 2005*).

Bisogna infine considerare che nella maggior parte delle occasioni si manifestano solo parte di questi segni clinici e che l'evenienza più frequente, ma più difficilmente riconoscibile, è proprio quella dei casi “border line”.

In queste circostanze, *Rossdale e collaboratori (1984)* hanno proposto di seguire delle linee guida che comprendono: esame clinico (fisico e del comportamento); attività post-natale della corticale surrenale (livelli ematici di ACTH e cortisolo) ed eventualmente del sistema renina-angiotensina; rilievi ematologici (volume cellulare medio, conta dei globuli bianchi e rapporto neutrofili/linfociti); stato acido-base (pH ematico); metabolismo dei carboidrati (glicemia ed insulinemia).

6.3.Valutazioni di Laboratorio

PARAMETRI EMATOLOGICI

I puledri con incompleta maturazione del surrene presentano, alla nascita, leucopenia e alterazione della formula leucocitaria con un rapporto neutrofili:linfociti inferiore ad 1 (normalmente tale rapporto dovrebbe essere maggiore di 2, a 3-4h dal parto) (*Knottenbelt, Holdstock, Madigan, 2004*).

Nel caso si rilevi neutropenia è opportuno valutare l'eventuale presenza primaria o secondaria di uno stato settico.

Puledri in cui non si verifichi un incremento dei globuli bianchi totali entro le prime 24-48h generalmente non riescono a sopravvivere (*Guy D. Lester, BVMS, PHD, 2005*).

In puledri prematuri sono riportate anche alterazioni del volume cellulare medio (MCV) che risulta spesso più elevato della norma.

Un incremento della fibrinogenemia è invece un indice prognostico favorevole, poiché può riflettere un'esposizione ad infezione batterica in utero prima del parto.

Il pH ematico nei prematuri/dismaturi è inferiore a 7,3 (normalmente è superiore) e tende a rimanere basso in parallelo a concentrazioni crescenti di lattato; questi sono indici di una probabile sofferenza perinatale (ipossia).

Per quanto riguarda la glicemia, nei puledri prematuri, il suo valore alla nascita è significativamente inferiore rispetto ai puledri a termine e continua a diminuire anche nelle due ore successive al parto.

I ridotti livelli di glicemia alla nascita e nell'immediato post-parto sono probabilmente dovuti alle scarse riserve di glicogeno epatico, all'im maturità dei meccanismi glicogenolitici e alla mancata attivazione di tali meccanismi (ridotta risposta funzionale delle cellule β -pancreatiche); tutti fattori a loro volta legati allo sviluppo dell'asse ipofisi-surrene (*Fowden et al. 1984*).

L'ipoglicemia che si riscontra nei puledri prematuri/dismaturi, associata alla deficitaria produzione di ormoni tiroidei cortisolo-indotta, comporta spesso un'incapacità di adattamento alla temperatura esterna; di conseguenza questi soggetti vanno frequentemente incontro ad ipotermia post-natale.

PARAMETRI ORMONALI:

I puledri prematuri mostrano basse concentrazioni di cortisolo plasmatico alla nascita a dispetto di un'idonea concentrazione di ACTH; la concentrazione di cortisolo tende a rimanere bassa anche nelle ore successive (quando normalmente nei puledri a termine si registra invece un incremento repentino della cortisolemia).

Nei puledri con caratteristiche intermedie (dismaturi) la concentrazione di cortisolo alla nascita è analoga a quelle dei prematuri ma cresce più repentinamente nelle ore successive al parto anche se non raggiunge i livelli circolanti rilevati nei puledri a termine.

Per quanto riguarda la concentrazione plasmatica di ACTH, alla nascita, questa risulta addirittura superiore nei puledri prematuri rispetto a quelli dismaturi e a termine; rimane elevata per 15-60 minuti e declina rapidamente nelle ore successive al parto, con un andamento analogo a quello riscontrato nei dismaturi e nei puledri a termine, stabilizzandosi però su valori più elevati; ciò fa supporre che la bassa cortisolemia riscontrata nei puledri prematuri non sia dovuta tanto ad una ipofunzionalità ipofisaria quanto ad un'insufficiente risposta funzionale della corticale del surrene fetale all'incremento di ACTH indotto a sua volta da qualsiasi forma di stress in utero.

Pertanto, nei puledri prematuri, la persistente secrezione di ACTH dopo la nascita potrebbe essere legata all'assenza o all'insufficienza del feedback negativo esercitato su l'ipofisi da parte dei bassi livelli di cortisolo circolante.

Tale ipotesi risulta supportata dal minimo incremento della cortisolemia, che si registra nei puledri prematuri, in seguito alla somministrazione esogena di ACTH (0,125 mg/i.m.) (*Silver et al. 1984*).

Il tasso di progestageni plasmatici è di solito elevato nei puledri prematuri e dismaturi rispetto ai livelli riscontrati nei puledri a termine.

Pertanto il rilievo di una bassa concentrazione di cortisolo fetale e l'incremento di quella dei progestageni possono fornire un'ulteriore indicazione sul mancato/insufficiente completamento dello sviluppo fetale (*Houghton, Holtan, Grainger, 1991*).

6.4. Alcune cause di parto prematuro

Una delle principali cause di parto prematuro, patologie perinatali o mortinatalità è l'induzione con ossitocina o prostaglandine esogene del parto prima del termine fisiologico. Data l'enorme variabilità della durata della gestazione, in linea generale è sempre preferibile cercare di mantenere la gravidanza in modo da assicurare un'adeguata maturazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene del feto cui è legato a cascata lo sviluppo di tutti gli altri sistemi organici.

Il parto prematuro può essere la conseguenza di **problemi placentari non infettivi**: distacco placentare che determina un'interruzione del passaggio di ossigeno e nutrienti al feto o insufficiente superficie placentare, come si verifica in caso di gravidanza gemellare e che comporta un ritardo dell'accrescimento in utero.

Paradossalmente invece l'**infezione placentare** rappresenta un fattore prognostico favorevole per la sopravvivenza del puledro, poiché sembra accelerarne lo sviluppo in utero (*Rossdale et al. 1991*).

A conferma di ciò, vista l'interdipendenza tra ormoni corticosurrenali e progestageni materni, il dosaggio di questi è stato utilizzato come indice predittivo della salute feto-placentare e rapportato alla funzionalità dell'asse ipofisi-surrene fetale.

Da studi condotti su fattrici affette da placentite, è infatti emerso che questa condizione patologica può alterare il profilo endocrino dei progestageni nella tarda gravidanza in rapporto al decorso acuto o cronico dell'infezione; questa alterazione del profilo endocrino può essere riprodotta sperimentalmente (*Rossdale et al. 1991; Stawicki et al. 2002; LeBlanc, 2004*).

Nel danno placentare acuto si registra generalmente una caduta dei livelli di progestageni materni in associazione ad un'ipofunzionalità corticosurrenalica fetale e frequentemente si verifica l'aborto della cavalla; caso tipico di tale condizione è l'intossicazione da *Festuca arundinea*.

Se invece l'infezione si instaura nell'arco di alcuni giorni (decorso cronico), i progestageni tendono ad aumentare prematuramente con un andamento simile a quello che si ha fisiologicamente negli ultimi 15-20 giorni prima del parto; la funzionalità della corticale surrenalica risulta normale o addirittura aumentata indicando uno stato di stress del feto; l'esito del parto è prematuro ma i puledri riescono frequentemente a sopravvivere.

Tali risultati suggeriscono che, se l'infezione dei tessuti placentari avviene con anticipo sufficiente rispetto al termine previsto (almeno 2-3 settimane), questa può promuovere la maturazione fetale.

Lo stimolo ad accelerare la maturazione è probabilmente indotto dalla liberazione di fattori infiammatori: citokine nei tessuti fetali e placentari; prostaglandine nei liquidi fetali.

Da un punto di vista clinico: i puledri che nascono in seguito a stress cronici in utero (es: placentite cronica) sono solitamente deboli e depressi; necessitano di un tempo maggiore per alzarsi e spesso devono essere aiutati

per rimanere in stazione quadrupedale; il riflesso di suzione può essere ridotto o assente e per alcuni è opportuna la somministrazione dell'alimento con sonda naso-gastrica; i puledri mostrano inoltre problemi di termoregolazione e difficoltà a mantenere costante la glicemia.

Tuttavia, superate le prime 24h, la maggior parte di questi soggetti mostra un netto miglioramento sia fisico che sensorio, recuperando rapidamente esuberanza ed appetito.

Al contrario puledri che nascono con incompleta maturazione dell'asse ipofisi surrene, necessitano di solito di un'immediata rianimazione e, con il passare delle ore, tendono clinicamente a peggiorare manifestando un'ampia varietà di complicazioni.

Intossicazione da *Festuca arundacea*

Il consumo di festuca contaminata dal micete *Neotyphodium coenophialum* durante la gravidanza provoca un'intossicazione della fattrice associata a: aborti a termine o prolungamento della gestazione; mortalità perinatale o nascita di puledri dismaturi; agalassia e ritenzione placentare (*Cross, Redmond, Strickland, 1995*).

Gli episodi di distocia sembrano essere legati all'abnorme accrescimento scheletrico del feto conseguente al prolungamento della gravidanza. Il ritardo del parto appare a sua volta legato all'interferenza della tossina con il CRH fetale e quindi con lo sviluppo dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene.

I puledri nati in seguito all'intossicazione materna sembrano inoltre sviluppare una sindrome congenita muscolo-scheletrica da ipotiroidismo (carenza di T3), caratterizzata da: deformità flessorie, mancata ossificazione e prognatismo mandibolare; questa sindrome sarebbe peraltro compatibile con il fallimento della maturazione della funzione endocrina tiroidea cortisolo-indotta (*Allen et al. 1994; Boosinger et al. 1995*).

6.5.Sindromi più frequenti nei puledri prematuri/dismaturi

6.5.1. Sindrome da maladattamento neonatale (NMS) - Asfissia perinatale (PAS) - Encefalopatia ipossi-ischemica (HIE)

È una sindrome multifattoriale che colpisce i puledri nei primi giorni di vita.

L'ampia varietà di nomi con i quali è conosciuta riflette la variabilità delle caratteristiche cliniche con cui può manifestarsi; pertanto la denominazione più idonea dipenderà dalla prevalenza di alcuni sintomi rispetto ad altri.

Probabilmente la definizione di Sindrome da Maladattamento Neonatale introdotta da *Rossdale (1972)* è quella che meglio descrive in senso generale l'incapacità dei puledri prematuri/dismaturi di adattarsi alla vita extra-uterina, comprendendo tutte le disfunzioni organiche ad essa associate.

La sindrome sembra colpire prevalentemente puledri nati da tagli cesarei o rianimati alla nascita (prematuri) ed essere strettamente legata ad alterazioni e distacchi placentari, aspirazione di meconio, difetti cardiaci fetali e parti lenti/difficoltosi: tutte condizioni che comportano ipossia (ridotta concentrazione ematica di ossigeno) e danno ischemico (ridotta perfusione dei tessuti) e che pertanto risultano, se non le cause scatenanti, sicuramente quelle predisponenti alle successive complicanze che colpiscono i diversi apparati.

In alcuni casi tuttavia tale sindrome insorge inaspettatamente anche in seguito a parti rapidi e apparentemente non complicati e vi sono anche casi in cui, nei puledri affetti, non si manifesta alcuna sintomatologia fino a diverse ore dopo la nascita (*Vaala, 1994; Knottenbelt, Holdstock, Madigan, 2004*).

- Sistema Nervoso Centrale

Questa forma è caratterizzata da encefalopatia ipossi-ischemica associata ad emorragia, edema e necrosi cerebrale.

Il danno ipossi-ischemico infatti comporta una riduzione dell'apporto ematico e dell'ossigenazione a livello cerebrale; la conseguenza diretta è la necrosi delle cellule nervose. In seguito all'insulto ischemico e alla necrosi si ha una perdita di continuità dell'endotelio dei capillari e la formazione di edema cerebrale. Inoltre aumenta la concentrazione di aspartato e glutammato nel compartimento extracellulare; in particolare il glutammato è un neurotrasmettitore eccitatorio che in concentrazioni sufficientemente elevate può agire come neurotossina.

L'HIE si manifesta nel puledro con una serie di anomalie comportamentali più o meno evidenti a seconda della gravità: debole riflesso di suzione, depressione intermittente, perdita del riconoscimento ambientale e materno, tendenza a stare con la testa negli angoli, sguardo fisso e atteggiamento di "stupore", letargia, movimenti in circolo e di pedalamento, biascicamento, arricciamento delle labbra, alterazioni del riflesso pupillare, della frequenza cardiaca e respiratoria (lunghi periodi di apnea), aumento della pressione e vocalizzazioni abnormi (riportate in letteratura ma di raro riscontro nella pratica) fino all'insorgenza di tremori, ipotonia e rigidità muscolare che precedono le vere e proprie manifestazioni convulsive. È importante distinguere le convulsioni dai movimenti disordinati e dai tremori che si instaurano per lieve ipossia e che possono essere fermati semplicemente con una debole contenzione (*Vaala, 1994*).

Fatta eccezione per alcuni rari casi in cui si palesa tutto il quadro sintomatologico, spesso i segni sono talmente poco evidenti da passare del tutto inosservati e l'unica cosa che si rileva è lo stato letargico e di stupore.

L'incipit della sindrome è variabile poiché ci sono puledri che manifestano una sintomatologia nervosa fin dalla nascita e altri che appaiono assolutamente normali per ore/giorni (*Bernard et al. 1995*).

Anche la durata dei segni clinici è variabile e dipende dalla loro gravità. Alcuni soggetti guariscono in pochi giorni con la remissione della sintomatologia in ordine inverso rispetto alla sua insorgenza: ripresa dell'adattamento ambientale, ripresa dell'idonea postura in stazione quadrupedale e in deambulazione e ripresa dell'allattamento (*Bernard, 2003*).

- **Ridotta Perfusione Ematica**

Si manifesta clinicamente con estremità fredde, edema addominale e agli arti, cianosi delle mucose ed allungamento del tempo di riempimento capillare (normalmente <2sec).

Con la progressiva riduzione della perfusione, il polso diviene sempre più difficilmente palpabile, si ha una forte riduzione del pH ematico, mentre aumenta repentinamente il gap anionico e la concentrazione di lattato (*Guy D. Lester, BVMS, PHD, 2005*).

La grande quantità di acido lattico, prodotto per l'instaurarsi del metabolismo anaerobio nei tessuti, non può essere rimossa finché non sia ripristinato un flusso ematico idoneo.

La ridotta perfusione ha ripercussioni soprattutto a livello renale dove si può instaurare una necrosi tubulare acuta di grado variabile.

I segni clinici includono: oliguria (<1mg/kg/h) e edemi periferici.

Dagli esami di laboratorio si rileva: elevata concentrazione di creatinina sierica e di γ -GT nelle urine; disturbi elettrolitici, quali ipocalcemia, iponatriemia e ipocloremia, conseguenti al danno tubulare (*Vaala, 1994*).

- **Disfunzioni Gastro-Enteriche**

Solitamente chiari segni di alterazione anatomo-funzionale dell'apparato gastroenterico sono poco evidenti nei puledri prematuri/dismaturi, fatta

eccezione per la scarsa tolleranza all'alimentazione forzata conseguente all'incompleta maturazione di questo apparato.

La forma associata o conseguente al danno da ipoperfusione ed ischemico da asfissia perinatale ne aggrava il quadro patologico e ne esacerba i sintomi; in questo caso si può osservare stasi intestinale e ridotto passaggio fecale, cui può conseguire distensione gastrica.

Nella specie umana, la combinazione di stato asfittico prolungato e prematurità, costituisce un importante fattore di rischio per lo sviluppo di enterocolite necrotizzante (NEC); tale condizione è stata osservata anche nel puledro.

Le manifestazioni cliniche comprendono in tal caso: ileo, scarso appetito, coliche, letargia, distensione addominale, reflusso e distensione gastrica e diarrea. I segni di sepsi generalizzata per il passaggio di tossine in circolo conseguente alla necrosi e all'eventuale colonizzazione batterica possono precedere quelli propri della NEC (*Vaala, 1994*).

All'esame radiologico si evidenzia un chiaro meteorismo intestinale accompagnato o meno da una distensione gastrica.

- Alterazioni del Sistema Respiratorio

La maggior parte dei puledri prematuri e dismaturi mostrano un certo grado di insufficienza polmonare alla nascita.

Tra i fattori di rischio che maggiormente li predispongono a problemi respiratori si annoverano: incompleta maturazione strutturale e funzionale, incompetenza del sistema immunitario, alterazioni dell'emodinamica ed insufficiente produzione di surfattante. Quest'ultima condizione, accompagnata dalla presenza di focolai atelettasici, spiega l'insorgenza di ipossia o addirittura di asfissia.

Inoltre in tutti i puledri la cassa toracica è stretta e nei soggetti depressi, che tendono a stare molto a lungo sdraiati sul fianco, ciò può ostacolare ulteriormente l'ingresso di aria nei polmoni riducendone la capacità espansiva.

Quindi nella maggior parte dei prematuri/dismaturi si manifesta clinicamente: ridotta capacità ventilatoria, tachipnea, ipossia ed ipercapnia di grado variabile. Questi soggetti risultano inoltre più suscettibili allo sviluppo di atelettasia.

Il puledro può, tuttavia, non presentare alcun sintomo clinico, riferibile ad una compromissione respiratoria, per 24-48h successive al parto; per cui l'esame radiografico diventa essenziale per stabilire il grado di maturità polmonare alla nascita.

All'esame radiografico si evidenzia, come riscontro più frequente, un pattern di tipo interstiziale, ma è praticamente impossibile differenziare uno stato infiammatorio dall'atelettasia.

Come ausilio nel monitoraggio delle disfunzioni respiratorie può essere utilizzata l'emogasanalisi per valutare: pH, pO₂ e pCO₂. (*Guy D. Lester, BVMS, PHD, 2005*).

6.5.2. Sindrome da distress respiratorio neonatale (NRDS) o malattia delle membrane jaline.

La Sindrome da Distress Respiratorio è la principale causa di morte nei puledri neonati (*Koterba, 1991*) e sembra avere una maggiore incidenza in soggetti che non abbiano superato i 300 giorni di gestazione.

L'asfissia, la diminuita perfusione utero-placentare (taglio cesareo), l'interruzione dell'apporto ematico fetale (distacco placentare), la prematurità e la dismaturità ne rappresentano i maggiori fattori di rischio (*Sonea, 1985*).

La principale manifestazione anatomico-patologica della NRDS è l'atelettasia, cioè il collasso degli alveoli polmonari durante la fase espiratoria, dovuta al deficit di surfattante.

Il fattore patogenetico primario è rappresentato dall'imaturità funzionale del polmone, specificatamente dei pneumociti di tipo II, con deficit della produzione di surfattante.

Tale deficit, oltre a causare un'incompleta espansione degli alveoli in fase inspiratoria ed un collabimento delle pareti alveolari in fase espiratoria, genera elevate pressioni negative nello spazio interstiziale; a ciò consegue la trasudazione di liquido dal microcircolo (edema alveolare) che favorisce lo sviluppo e l'organizzazione di membrane jaline acidofile (condensato di materiali plasmatici quali albumina, fibrinogeno, fibrina, fosfolipidi, polisaccaridi e detriti di cellule epiteliali necrotiche desquamate) che vanno a tappezzare le ultime diramazioni bronchiolari e i condotti alveolari. L'azione ostruttiva delle membrane jaline, la progressiva atelettasia e l'edema sono responsabili della grave insufficienza respiratoria che caratterizza la maggior parte dei casi di questa affezione.

L'imaturità funzionale del polmone, a carico dei pneumociti di tipo II, e la deficitaria produzione di surfattante sono state ricondotte nei suinetti neonati ad ipotiroidismo fetale e probabilmente anche ad ipocorticosurrenalismo (*Marcato, 1988*); tale correlazione non è stata accertata nel puledro, anche se sembra evidente il coinvolgimento del surfattante (*Paradis, 1987*) e dei meccanismi legati alla sua produzione (maturazione dell'asse ipofisi-surrene fetale) nella patogenesi di questa sindrome .

L'esito dell'NRDS, quasi sempre fatale, è una grave ed irreversibile insufficienza respiratoria, con squilibrio della ventilazione-perfusione, ipossia, ipercapnia ed acidosi (*Marcato, 1988*).

I puledri affetti presentano tachipnea di entità variabile fino all'apnea. Gli atti respiratori sono amplificati, in fase inspiratoria o espiratoria, manifestandosi con due tipi diversi di respirazione: costo-addominale o prettamente costale (con arretrazione delle coste).

Nei casi di marcata atelettasia polmonare si osservano: allargamento delle narici, respirazione orale, “grugniti” espiratori e cianosi (*Walser e Hartwig, 1993*).

All'esame radiografico si osserva tipicamente un grave pattern alveolare; l'esame citologico da aspirato trans-tracheale permette di distinguere questa forma dalle infezioni polmonari.

PARTE SPERIMENTALE

7. SCOPO DELLA TESI

Lo scopo che ci siamo proposti di ottenere con la presente sperimentazione è stato quello di valutare l'andamento delle concentrazioni di ACTH e cortisolo nelle prime 48h di vita in puledri sani e malati così da comprendere e verificare non solo quello che è già stato indicato dalla letteratura, ma anche come questi parametri potrebbero essere usati a fini pratici per la valutazione dei vari problemi perinatali del puledro, con particolare riferimento a quella che è la sindrome più diffusa ed eterogenea, da un punto di vista clinico-patologico: la Sindrome Asfittica Perinatale (o Sindrome da Maladattamento Neonatale).

A tale scopo ci siamo prefissati di: studiare il rapporto di dipendenza nel tempo tra la secrezione ipofisaria di ACTH e la risposta corticosurrenalica (liberazione di cortisolo); valutare l'esistenza di eventuali differenze nelle concentrazioni plasmatiche di ACTH e cortisolo tra puledri sani e malati; ed infine ricercare una correlazione tra i tassi plasmatici di ACTH e cortisolo e i rilievi clinici e di laboratorio di rapida esecuzione sul campo per stabilire se lo studio dell'asse ipofisi-surrene nel puledro alla nascita possa, da un punto di vista clinico, collocarsi come indicatore, nel panorama delle valutazioni utili per la determinazione del suo livello di maturità.

8. MATERIALI E METODI

Lo studio è stato condotto presso la stazione di monta “La Piaggia”, situata nella provincia di Pisa, su 60 puledri trottatori nati tra Aprile e Giugno nell’arco di due stagioni riproduttive. Di questi 28 erano femmine e 32 maschi.

Le fattrici gravide erano tenute in recinti per tutta la durata della gestazione, isolate o in gruppo; pochi giorni prima del termine (scadenza del tempo di gestazione calcolata approssimativamente in base alla data dell’ultima ovulazione prima della gravidanza, stabilita per mezzo dell’esame ecografico transrettale) venivano spostate in box singoli di 4x4m, con lettiera in paglia, muniti di telecamere a circuito chiuso per essere monitorate durante le ore notturne.

8.1.Dati raccolti sulle fattrici

Sulle cavalle che superavano i 320 giorni di gestazione è stato effettuato un controllo quotidiano dei segni clinici indicativi dell’imminenza del parto: valutazione dello sviluppo mammario mediante palpazione manuale (progressivo aumento di volume e turgidità del capezzolo); valutazione macroscopica del secreto mammario, attraverso la raccolta di una piccola quantità in contenitori trasparenti per apprezzarne il colore (può variare dal giallo paglierino al bianco latte man mano che si avvicina il parto) ed esame tattile per stimarne il grado di viscosità (questa aumenta con l’approssimarsi del parto); osservazione dell’eventuale presenza di edema vulvare.

Inoltre sono stati raccolti i dati anamnestici relativi alla carriera riproduttiva delle cavalle: fattrici primipare o di secondo parto; problemi insorti nelle

gravidanze precedenti, difficoltà al parto, nascita di puledri prematuri, dismaturi e mortinatalità.

Prima del parto le cavalle ricevevano una razione costituita da fieno di graminacee di buona qualità e cereali fioccati; dopo il parto l'alimentazione veniva integrata con erba medica per soddisfarne l'incrementato fabbisogno proteico.

Tutte le fattrici sono state annualmente vaccinate per l'influenza equina e per il tetano; per quanto concerne la vaccinazione relativa all'aborto equino da Herpes Virus Equino tipo1 (EHV-1), durante la gestazione sono stati effettuati 3 richiami al quinto, settimo e nono mese.

Venivano eseguiti regolari trattamenti antelmintici e, in particolare le fattrici, ricevevano il vermifugo (ivermectina: 0,2mg/kg p.o.) subito dopo il parto per impedire il passaggio delle uova di parassiti dalla madre al puledro.

8.2.Dati raccolti sui puledri

Pochi minuti (1-5min) dopo l'espletamento del parto e l'accertamento del sesso del neonato, sui puledri è stato eseguito un esame semiologico per determinarne il grado di vitalità/maturità.

Questo è stato valutato in base al punteggio APGAR (*Martens, 1982*) che prende in considerazione 4 parametri: frequenza cardiaca, frequenza e carattere del respiro, tono muscolare e stazione, reazione agli stimoli esterni.

Ad ogni parametro è stato assegnato un punteggio da 0 a 2 (vedi tabella 1).

PARAMETRO	0	1	2
Frequenza Cardiaca	Assente	<60bpm	>60bpm
Frequenza e Carattere del Respiro	Assente	lento, irregolare	>60arm
Tono Muscolare e Stazione	estremità flaccide, sdraiato	flessione degli arti, sdraiato	decubito sternale
Reazione a Stimoli Esterni	nessuna risposta	reazione debole	reazione vigorosa

Tab. 1: Sistema APGAR modificato per valutare i puledri a 1-5min dalla nascita (Martens, 1982).

L'indice di stima della vitalità si ottiene sommando i punteggi relativi ad ogni singola valutazione:

- 0-3 → depressione marcata, grave asfissia, prognosi infausta o assai riservata, necessità di rianimazione primaria immediata;
- 4-6 → moderata depressione, asfissia da debole a moderata, necessità di intervento terapeutico;
- 7-8 → puledro normale

Successivamente i puledri sono stati sottoposti ad un'attenta visita clinica che ha compreso:

- esame dell'ombelico; dopo la rottura del cordone ombelicale, il moncone è stato disinfettato con tintura di iodio e questo trattamento è stato ripetuto quotidianamente nei giorni seguenti;
- temperatura corporea; considerata normale se compresa tra 37 e 38°C;
- frequenza cardiaca; considerata normale fra 80-130 bpm nei primi 7-30min e fra 30-40 bpm nelle prime 1-12h dal parto;
- frequenza respiratoria; per contare gli atti respiratori è necessario mantenersi a debita distanza dal puledro, così da evitare un'inutile eccitazione del soggetto che potrebbe falsificare la nostra valutazione;
- verifica della presenza del riflesso di suzione; considerato anormale se debole;

- verifica della presenza del riflesso di alzare la testa; considerato normale se immediato;
- tempo impiegato per l'assunzione della posizione sternale; considerato nella norma se <2-3min;
- tempo impiegato per l'assunzione della stazione quadrupedale; considerato normale se <160min;
- tempo impiegato per la prima poppata; considerato nella norma se entro 3h. E' molto importante determinare dopo quanto tempo dalla nascita il puledro si attacchi alla mammella materna e verificare, osservando il passaggio dell'alimento attraverso l'esofago, la reale e adeguata assunzione di colostro necessario per il trasferimento dell'immunità passiva.

I puledri che hanno avuto difficoltà a rimanere in stazione quadrupedale sono stati aiutati a raggiungere la mammella; nei casi in cui i puledri non si siano allattati entro le 5 ore dalla nascita, le fattrici sono state munte ed il colostro è stato somministrato loro con un biberon.

In seguito, al fine di prevenire gli sforzi che spesso si accompagnano al passaggio del meconio, sono stati effettuati dei clisteri a base di soluzione salina; il passaggio di meconio è stato comunque verificato ed annotato.

Tutti i puledri sono stati sottoposti dopo la nascita alla profilassi antitetanica, con la somministrazione di 1500 unità di antitossina tetanica che generalmente offre una copertura di almeno 3 mesi.

Lo stato clinico dei puledri è stato monitorato per tutta la prima settimana di vita, ponendo particolare attenzione all'eventuale comparsa di sintomi a carico dell'apparato respiratorio e gastroenterico.

8.3. Esame macroscopico degli invogli fetali:

Al momento del parto è stato prelevato un campione di liquido amniotico direttamente dal sacco che lo contiene, prima della sua rottura, con la cavalla in stazione quadrupedale o in decubito sternale; il liquido è stato valutato macroscopicamente secondo tre gradi di limpidezza (scarsa, media ed ottima), in funzione della trasparenza, del colore e della torbidità.

Una volta avvenuto il secondamento, è stata effettuata un'attenta osservazione dei residui del sacco amniotico, della placenta e del cordone ombelicale.

La placenta è stata disposta ad "F", secondo quanto proposto da *Koterba (1990)*, con la faccia allantoidea visibile; prima di tutto ne è stata valutata integrità e completezza, quindi dimensione (su un supporto quadrettato da 1cm² a quadretto), spessore, colore e presenza o meno di zone ispessite, assottigliate o edematose.

Successivamente è stata pesata, considerando che sembra esserci una correlazione diretta dell'11% tra peso della placenta e quello del puledro (*Koterba, 1990*).

È stata misurata la lunghezza di ciascun cordone ombelicale ed è stata annotata l'eventuale presenza di anomalie macroscopicamente apprezzabili.

Nei casi in cui si è verificata la ritenzione della placenta, per favorirne l'espulsione, alle fattrici è stata somministrata ossitocina.

8.4. Prelievi di routine

Subito dopo la nascita e prima che avvenisse l'allattamento è stato effettuato il prelievo di un piccolo campione di sangue in provette con EDTA per la determinazione della glicemia, mediante l'utilizzo di un glucometro elettrochimico (*Glucotest[®], Menarini, Firenze*).

Si tratta di un dispositivo di analisi quantitativa che ci permette di ottenere un risultato molto rapido (ca.20min) utilizzando una sola goccia di sangue intero.

Per verificare il passaggio di un'adeguata quantità di immunoglobuline, è stato impiegato lo *SNAP[®] Foal IgG Test Kit (IDEXX, USA)*, test enzimatico semiquantitativo, utilizzabile su sangue intero, siero o plasma.

Nel nostro caso, a 24h ore dalla nascita è stato effettuato il prelievo di sangue, trasferito in una provetta sterile senza anticoagulante, sottoposto a centrifugazione (a 3000 RPM per 4min) ed ottenuto il siero su cui eseguire il test.

In base al risultato, il trasferimento dell'immunità passiva è stato valutato (*Koterba, 1984*):

- *ottimale* se >800mg/dl;
- *parziale* se compreso tra 400mg/dl e 800mg/dl;
- *mancato* se <400mg/dl.

In caso di parziale trasferimento, il prelievo ed il test venivano ripetuti a 36h; se il risultato era confermato si procedeva alla somministrazione al puledro di plasma iperimmune (sacca da 500ml, somministrata per i.v.), intervento terapeutico sempre praticato per valori <400mg/dl.

8.5. Protocollo sperimentale

I campioni ematici dei puledri sono stati ottenuti in tre sessioni: T1 (0-6h dalla nascita); T2 (24h); T3 (48h), attraverso il prelievo dalla vena giugulare esterna, previa disinfezione del collo, di 4ml di sangue cercando di evitare, durante le manualità, l'eccitazione del soggetto.

Il prelievo di 4ml di sangue totale è stato ripartito in due aliquote trattate in modo diverso a seconda del tipo di indagine previsto.

- **Cortisolo:** 2ml di sangue sono stati stoccati in una provetta contenente litioeparina e centrifugati a 3000 RPM per 5min; il plasma ottenuto è stato prelevato con una pipetta, trasferito in una provetta sterile e quindi congelato a -20°C; il campione è stato conservato a questa temperatura in attesa dell'analisi di laboratorio.

Dosaggio: immunometrico in fase solida in chemoluminescenza (IMMUNOLITE® 2005 Analyzer®, DPC®, Diagnostic Corporation, USA; distr.: Medical Systems S.P.A, Genova).

- **ACTH:** 2ml di sangue sono stati stoccati in una provetta contenente EDTA e centrifugati a 3000 RPM per 5min; il plasma ottenuto è stato prelevato con una pipetta, trasferito in una provetta sterile e subito dopo congelato a -20°C; il campione è stato conservato a questa temperatura in attesa dell'analisi di laboratorio.

Dosaggio: immunometrico sequenziale, a due siti, chemoluminescente in fase solida (IMMUNOLITE® 2005 Analyzer®, DPC®, Diagnostic Corporation, USA; distr.: Medical Systems S.P.A, Genova). Metodica validata per la specie equina (*Perkins et al. 2002*).

In entrambi i casi, prima del congelamento, le due aliquote di ciascun campione sono state identificate, riportando: T e data del prelievo, nome della fattrice ed indagine prevista (cortisolo o ACTH)

8.6. Analisi statistica

Vista l'ampia eterogeneità delle caratteristiche riscontrate nei singoli puledri, i gruppi sono stati suddivisi essenzialmente in base all'APGAR rilevato subito dopo la nascita e, dove questo fosse nella norma (7-8), per stabilire il gruppo di appartenenza di ogni soggetto, sono stati considerati tutti gli altri dati raccolti sul puledro (temperatura rettale, glicemia, presenza dei riflessi di

sollevamento della testa e di suzione, tempo impiegato per assumere la posizione sternale, tempo impiegato per assumere la stazione quadrupedale e per compiere la prima poppata, idoneità del trasferimento dell'immunità passiva ed eventuale necessità di intervento e terapie effettuate nel periodo perinatale) e, dove disponibili, sulla fattrice (dati anamnestici remoti/recenti, durata della gravidanza, caratteristiche della placenta, del liquido amniotico e del cordone ombelicale).

- Gruppo 1 → puledri con APGAR tra 7 e 8 e tutti gli altri parametri nella norma, considerati *sani*;
- Gruppo 2 → puledri con segni di *moderata* sindrome asfittica perinatale acuta; APGAR tra 4 e 6, con necessità di intervento terapeutico (trattamento con lobelina cloridrato e/o toldimfos e vitamine del gruppo B), debole riflesso di suzione, tempo per raggiungere la stazione quadrupedale > 160min, tempo trascorso dalla nascita alla prima poppata > 3h ed eventuale somministrazione forzata dell'alimento;
- Gruppo 3 → puledri con: APGAR tra 7 e 8, ma altri parametri, diversi da caso a caso, non nella norma.

Per ciascun gruppo sono state costruite delle tabelle in cui sono stati affiancati i risultati dell'analisi relativa alla concentrazione plasmatica di ACTH e cortisolo nelle prime 48h di vita (T1; T2; T3) e la valutazione degli altri parametri dei puledri e materni.

Per l'analisi statistica i gruppi utilizzati sono stati solo due poiché, visto lo scarso campione numerico rappresentato dai puledri del secondo gruppo (solo 4), i gruppi 2 e 3 sono stati accorpati in un unico gruppo di indagine denominato Gruppo *patologico*.

Sul campione totale è stata effettuata una regressione lineare per stabilire la dipendenza tra la concentrazione plasmatica di ACTH e cortisolo a T1, T2 e T3.

La regressione lineare è stata effettuata anche singolarmente sul Gruppo 1 dei *sani* e sul Gruppo *patologico* (Gruppo 2 e 3)

È stata anche svolta un'indagine con t-test di Student confrontando il Gruppo 1 e il Gruppo patologico per valutare l'esistenza di differenze statisticamente significative tra la concentrazione di ACTH e cortisolo a T1, T2 e T3.

9. RISULTATI

FATTRICE

La gestazione è durata mediamente 339 giorni con un range compreso tra un minimo di 319 ed un massimo di 382 giorni.

Delle 60 placentate esaminate: 3 sono state valutate dopo espulsione indotta con ossitocina, poiché ritenute; 2 sono state espulse al contrario (con la faccia corionica visibile invece che con quella allantoidea); 1 è stata espulsa insieme al puledro e presentava un odore putrido; 4 presentavano lesioni necrotiche ed ispessimento all'apice del corno gravido; 2 presentavano lacinie fibrose sul corpo; 1 presentava una colorazione anomala del lato corionico.

La limpidezza del liquido amniotico, valutato al momento del parto solo su 38 cavalle, poiché negli altri casi è andato perduto per rottura del sacco prima dell'osservazione, è risultata: in 21 casi di grado ottimo; in 15 casi di grado medio in 2 casi di grado scarso.

Delle 60 fattrici solo 6 riportavano dati anamnestici importanti ai fini del parto: 2 cavalle avevano avuto problemi rispettivamente di mortinatalità e

nascita di un puledro molto grosso al parto precedente; 1 cavalla presentava scadenti condizioni ponderali; 1 cavalla soffriva di laminite cronica; 1 cavalla presentava una mammella atrofica conseguente ad una mastite pregressa ed infine 1 cavalla presentava i segni ecografici di un precoce distacco placentare.

PULEDRI

Subito dopo la nascita (1-5min) è stato valutato il grado di vitalità di tutti i puledri in base al punteggio APGAR e sono emersi i seguenti risultati: a 40 puledri è stato assegnato un punteggio di 8 (66,7%), a 16 puledri un punteggio di 7 (26,7%), a 4 puledri un punteggio tra 4 e 6 (6,6%).

Dei 60 puledri esaminati (32 maschi e 28 femmine), in base al punteggio APGAR: 46 soggetti (ca. 76,7%) sono stati valutati come sani (Gruppo 1); 4 (ca. 6,7%) sono stati considerati affetti da una moderata sindrome asfittica perinatale (Gruppo 2); 10 (ca. 16,6%) sono stati considerati casi border-line (Gruppo 3).

Di tutti i puledri (Gruppo 1, 2 e 3) è stata misurata la glicemia il cui valore medio è risultato 67mg/dl con un range compreso tra un valore minimo di 34mg/dl ed un valore massimo 131mg/dl.

La temperatura rettale media è risultata di 37,3°C, con un range compreso tra un minimo di 35,7°C e un massimo di 38°C.

Per quanto riguarda la concentrazione plasmatica di ACTH e cortisolo sono stati riscontrati i valori riportati nella tabella seguente:

ACTH T1 (0-6h)	ACTH T2 (24h)	ACTH T3 (48h)	CORT T1 (0-6h)	CORT T2 (24h)	CORT T3 (48h)
189,0	7,3	13,0	8,6	2,1	0,5
65,9	6,3	22,6	17,1	4,3	4,8
85,1	8,1	10,0	15,9	5,8	2,3
363,5	75,6	21,9	10,9	1,4	1,3

425,0	22,7	26,9	10,9	0,8	1,0
356,5	20,6	17,6	6,8	3,4	0,9
215,0	9,1	11,9	14,3	3,1	3,3
399,0	20,0	34,6	10,2	2,0	1,0
249,0	15,2	21,3	10,7	3,2	1,0
362,0	15,0	25,5	8,0	3,5	2,8
310,0	14,7	19,1	10,3	3,5	2,4
315,0	32,3	19,1	9,1	0,3	2,6
313,5	11,7	8,6	9,4	3,5	1,9
92,6	5,0	10,8	10,4	4,9	3,4
324,0	16,1	23,5	9,6	3,2	4,3
647,0	19,2	13,7	9,4	3,0	3,3
632,0	28,9	24,9	8,1	1,5	2,3
409,0	68,9	54,7	15,0	3,0	4,6
76,4	14,1	12,6	14,7	3,1	3,5
173,0	62,5	29,4	10,6	3,4	2,2
425,0	28,5	83,9	14,3	3,7	2,5
216,0	23,1	20,9	11,4	3,1	3,9
182,0	21,6	24,7	19,5	5,5	6,8
679,0	38,8	24,4	8,6	4,9	2,6
166,0	14,5	69,2	8,3	3,2	5,6
326,0	12,5	20,8	7,4	2,9	2,2
698,0	5,0	20,2	10,2	6,0	1,6
545,0	18,6	15,2	14,5	4,3	4,8
533,0	20,8	25,3	10,2	4,0	3,4
359,0	23,8	26,0	11,6	3,6	5,4
223,0	72,8	77,8	9,4	5,3	3,5
801,0	128,0	22,3	12,8	2,3	2,1
1032,0	24,6	31,7	6,0	3,1	2,2
1184,0	52,6	19,1	8,7	3,3	2,3
300,0	86,1	36,3	11,2	3,7	3,2
659,0	12,4	21,5	11,7	2,4	2,6
203,0	86,1	28,5	12,0	3,4	3,8
302,0	20,6	16,2	12,0	4,2	2,8
216,0	40,6	81,4	10,3	4,6	6,7
301,0	18,2	36,2	11,5	3,9	3,4
131,0	23,1	20,9	11,8	2,8	2,2
274,0	19,3	18,4	8,3	3,5	3,0
216,0	25,8	61,7	13,8	7,8	4,7
477,0	15,8	26,8	12,0	2,3	1,4

414,0	25,5	25,0	8,3	2,0	2,9
817,0	24,9	12,8	16,6	6,1	3,2
176,0	20,2	22,6	16,4	2,7	1,6
265,0	18,0	11,7	15,0	1,4	2,3
377,0	18,8	28,9	12,0	2,1	2,3
238,0	15,3	63,1	11,9	2,9	4,3
318,0	26,2	23,4	12,3	4,1	2,6
559,0	17,3	78,8	12,7	4,5	3,4
370,0	21,5	24,6	13,7	3,6	4,1
104,0	20,9	35,7	15,9	3,5	2,2
413,0	228,0	25,4	9,1	2,2	2,0
648,0	12,8	55,3	9,6	1,8	1,8
543,0	8,5	32,5	7,8	3,6	2,9
927,0	19,7	56,2	9,2	1,7	1,2
584,0	32,5	21,5	9,7	4,1	2,3
365,0	37,9	98,2	12,7	2,4	6,2

Tab. 2: Concentrazioni plasmatiche di ACTH e cortisolo del campione totale dei puledri (n=60).

Il valore medio, il range e la mediana delle concentrazioni plasmatiche di ACTH e cortisolo, rilevate sul totale dei 60 puledri esaminati, sono state le seguenti:

ACTH:

- media: 392,8pg/ml +/- 238,1pg/ml a T1; 30,9pg/ml +/- 34,7pg/ml a T2; 31,1pg/ml +/- 20,9pg/ml a T3;
- range: valore minimo 65,9pg/ml e valore massimo 1189pg/ml a T1; valore minimo 5,0pg/ml e valore massimo 228,0pg/ml a T2; valore minimo 8,6pg/ml e valore massimo 98,2pg/ml a T3;
- mediana: 341,3pg/ml a T1; 20,3pg/ml a T2; 24,5pg/ml a T3.

Cortisolo:

- media: 11,3mcg/dl +/- 2,8mcg/dl a T1; 3,4mcg/dl +/- 1,3mcg/dl a T2; 3,0mcg/dl +/- 1,4mcg/dl a T3;

- range: valore minimo 6mcg/dl e valore massimo 19,6mcg/dl a T1; valore minimo 0,3mcg/dl e valore massimo 7,8mcg/dl a T2; valore minimo 0,5mcg/dl e valore massimo 6,8mcg/dl a T3;
- mediana: 10,9mcg/dl a T1; 3,4 a T2; 2,6 a T3.

Dallo studio statistico della regressione lineare sul totale dei puledri (n=60) è emersa a T1 una dipendenza statisticamente significativa di tipo negativo tra la concentrazione di ACTH e cortisolo, a T3 una dipendenza statisticamente significativa di tipo positivo, mentre a T2 non è risultata alcuna dipendenza statisticamente significativa tra la concentrazione di ACTH e cortisolo.

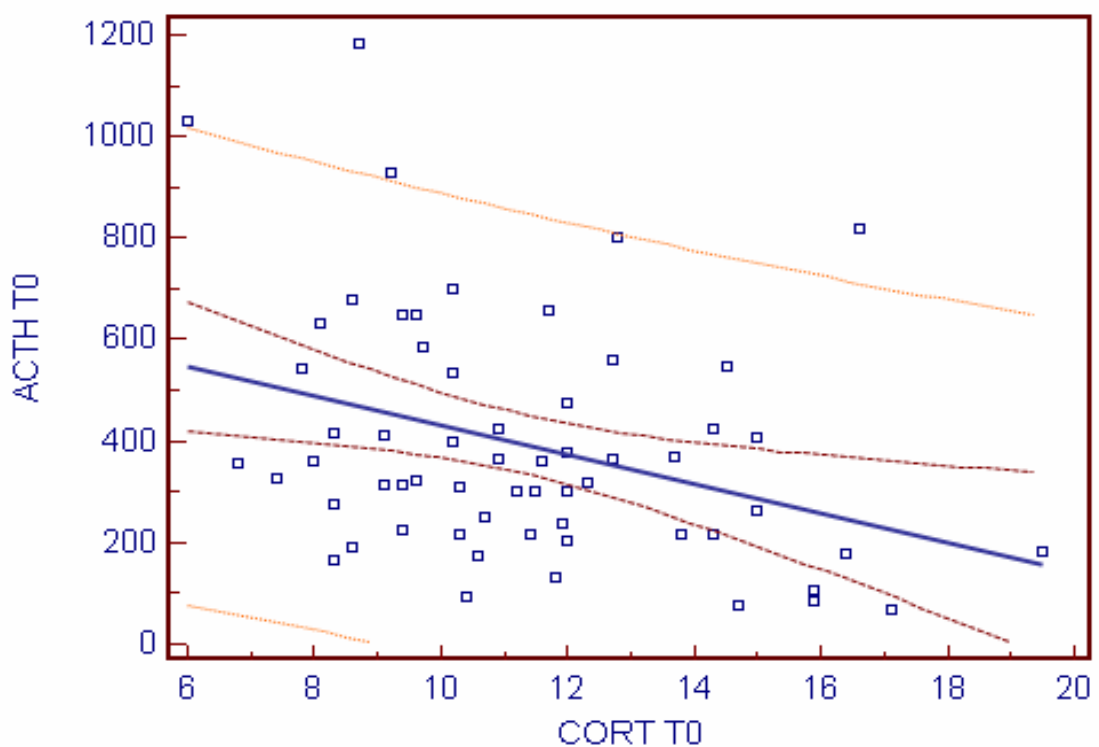


Grafico 1: Regressione a T1: n=60; P=0,008.

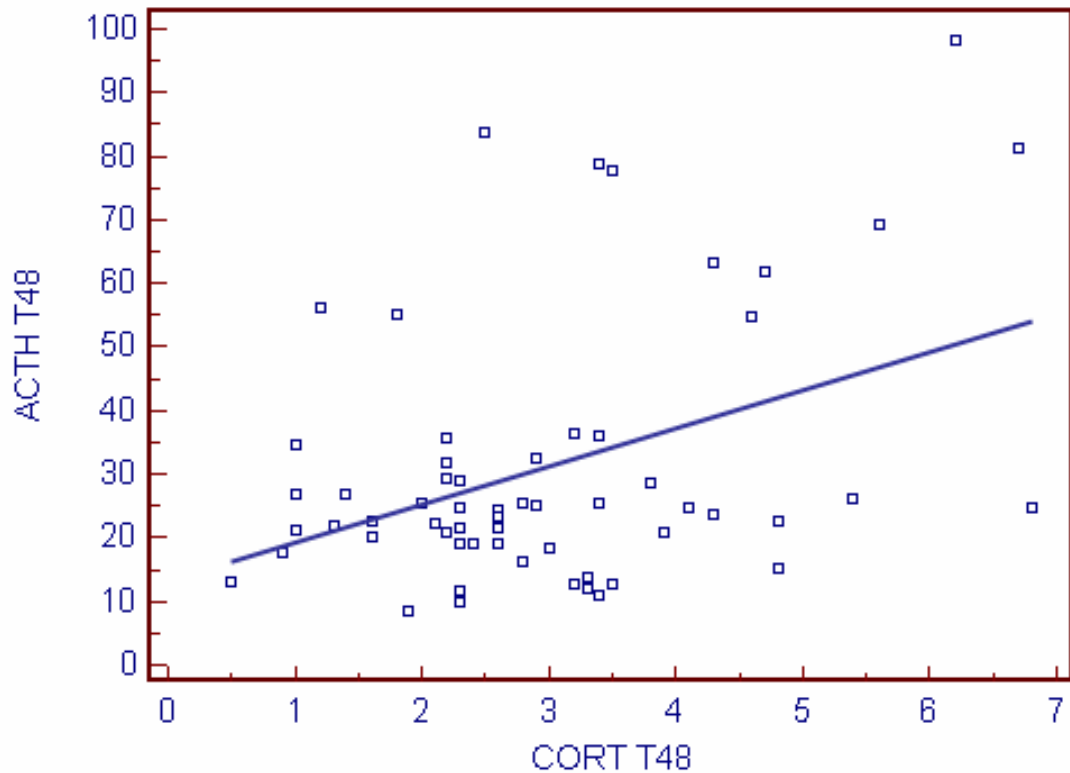


Grafico 2: Regressione a T2: n=60; P=0,001.

9.1. Gruppo 1 (SANI)

Nei 46 puledri appartenenti a questo gruppo l'APGAR è risultato pari ad 8, in 33 soggetti e pari a 7, negli altri 13.

La temperatura rettale media è risultata sempre nella norma (tra 37°C e 38°C) con un valore medio di 37,4°C; solo in un caso si è registrata una temperatura di 35,7°C senza però alterazione di nessun altro parametro clinico o di laboratorio.

La glicemia media è risultata di 70 mg/dl con un range tra i 40 mg/dl e i 131mg/dl.

I riflessi di suzione e di sollevamento della testa sono risultati in tutti i casi immediati e della giusta intensità.

Il tempo impiegato per assumere la posizione sternale è stato sempre nella norma e quindi compreso tra 1-3min; il tempo impiegato per assumere la stazione quadrupedale è sempre stato <160min e il tempo trascorso tra la nascita e la prima poppata sempre <3h; soltanto in un caso è stato necessario aiutare il puledro a raggiungere la mammella ma solo perché spaventato dalla fattrice cieca e quindi molto reattiva agli stimoli tattili indotti dal tentativo di suzione.

Alla valutazione del trasferimento dell'immunità passiva mediante lo SNAP® Foal Test, in 40 dei 46 casi si sono registrati valori superiori ad 800mg/dl; in 6 casi sono stati rilevati valori compresi tra 400 e 800mg/dl che però alla ripetizione del test compiuta dopo 36 h sono risultati >800mg/ml (1 di questi 6 puledri era figlio della fattrice con una mammella atrofica).

Per quanto riguarda la concentrazione plasmatica di ACTH e cortisolo sono stati riscontrati i valori riportati nella tabella seguente:

ACTH T1 (0-6h)	ACTH T2 (24h)	ACTH T3 (48h)	CORT T1 (0-6h)	CORT T2 (24h)	CORT T3 (48h)
92,6	5,0	10,8	10,4	4,9	3,4
647,0	19,2	13,7	9,4	3,0	3,3
409,0	68,9	54,7	15,0	3,0	4,6
76,4	14,1	12,6	14,7	3,1	3,5
173,0	62,5	29,4	10,6	3,4	2,2
425,0	28,5	83,9	14,3	3,7	2,5
216,0	23,1	20,9	11,4	3,1	3,9
326,0	12,5	20,8	7,4	2,9	2,2
698,0	5,0	20,2	10,2	6,0	1,6
545,0	18,6	15,2	14,5	4,3	4,8
533,0	20,8	25,3	10,2	4,0	3,4
801,0	128,0	22,3	12,8	2,3	2,1
300,0	86,1	36,3	11,2	3,7	3,2
203,0	86,1	28,5	12,0	3,4	3,8
302,0	20,6	16,2	12,0	4,2	2,8
131,0	23,1	20,9	11,8	2,8	2,2
274,0	19,3	18,4	8,3	3,5	3,0

414,0	25,5	25,0	8,3	2,0	2,9
817,0	24,9	12,8	16,6	6,1	3,2
176,0	20,2	22,6	16,4	2,7	1,6
265,0	18,0	11,7	15,0	1,4	2,3
377,0	18,8	28,9	12,0	2,1	2,3
370,0	21,5	24,6	13,7	3,6	4,1
104,0	20,9	35,7	15,9	3,5	2,2
413,0	228,0	25,4	9,1	2,2	2,0
648,0	12,8	55,3	9,6	1,8	1,8
584,0	32,5	21,5	9,7	4,1	2,3
365,0	37,9	98,2	12,7	2,4	6,2
632,0	28,9	24,9	8,1	1,5	2,3
359,0	23,8	26,0	11,6	3,6	5,4
238,0	15,3	63,1	11,9	2,9	4,3
318,0	26,2	23,4	12,3	4,1	2,6
477,0	15,8	26,8	12,0	2,3	1,4
1184,0	52,6	19,1	8,7	3,3	2,3
659,0	12,4	21,5	11,7	2,4	2,6
189,0	7,3	13,0	8,6	2,1	0,5
363,5	75,6	21,9	10,9	1,4	1,3
425,0	22,7	26,9	10,9	0,8	1,0
356,5	20,6	17,6	6,8	3,4	0,9
215,0	9,1	11,9	14,3	3,1	3,3
399,0	20,0	34,6	10,2	2,0	1,0
249,0	15,2	21,3	10,7	3,2	1,0
362,0	15,0	25,5	8,0	3,5	2,8
310,0	14,7	19,1	10,3	3,5	2,4
315,0	32,3	19,1	9,1	0,3	2,6
313,5	11,7	8,6	9,4	3,5	1,9

Tab. 3: Concentrazioni plasmatiche di ACTH (pg/ml) e cortisolo (mcg/dl) nelle prime 48h di vita dei puledri appartenenti al Gruppo 1 (sani).

Sui valori numerici riportati nella tabella 3 sono stati calcolati per ogni T (T1; T2; T3) i valori medi, il range e la mediana che sono risultati rispettivamente:

ACTH:

- media: 392,4pg/ml +/- 217pg/ml a T1 (0-6h); 33,1pg/ml +/- 38,4pg/ml a T2 (24h); 26,9pg/ml +/- 17,8pg/ml a T3 (48h);

- range: valore minimo 76,4pg/ml e valore massimo 1184,0pg/ml a T1; valore minimo 5,0pg/ml e valore massimo 228,0pg/ml a T2; valore minimo 8,6pg/ml e valore massimo 98,2pg/ml a T3;
- mediana: 360,5pg/ml a T1; 20,7pg/ml a T2; 22,1pg/ml a T3.

Cortisolo:

- media: 11, 3mcg/dl +/- 2,5mcg/dl a T1; 3,0 mcg/dl +/- 1,1mcg/dl a T2; 2,7mcg/dl +/- 1,2mcg/dl a T3;
- range: valore minimo 6,8mcg/dl e valore massimo 16,6mcg/dl a T1; valore minimo 0,3mcg/dl e valore massimo 6,1mcg/dl a T2; valore minimo 0,5mcg/dl e valore massimo 6,2mcg/dl a T3;
- mediana: 11,1mcg/dl a T1; 3,1mcg/dl a T2; 2,5mcg/dl a T3.

Dallo studio statistico di regressione lineare è emersa a T3 una dipendenza lineare statisticamente significativa di tipo positivo tra la concentrazione di ACTH e cortisolo, mentre a T1 e a T2 non si è evidenziata una dipendenza statisticamente significativa tra la concentrazione di ACTH e cortisolo.

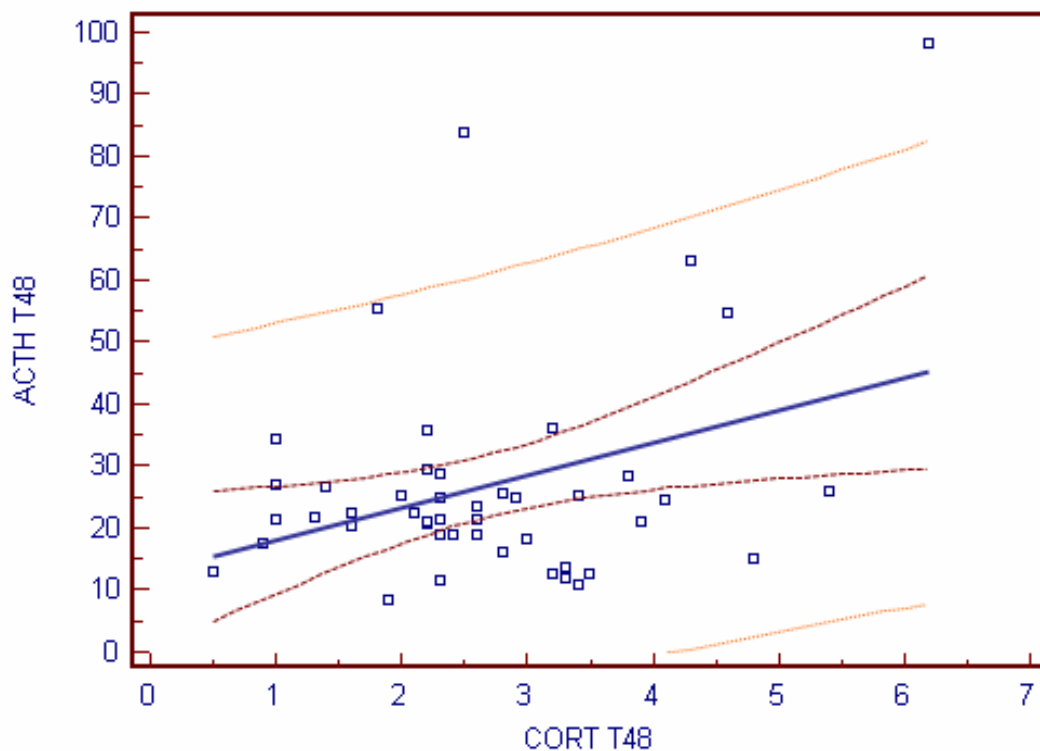


Grafico 3: Regressione a T3: n=46; P=0,0165.

9.2. Gruppo 2

Sono rientrati in questo gruppo solo 4 puledri con APGAR compreso tra 4 e 6 e con caratteristiche cliniche riconducibili ad una moderata sindrome asfittica perinatale acuta, che chiameremo Caso 1, Caso 2, Caso 3 e Caso 4 descrivendoli nel dettaglio.

In tutte le fattrici la durata della gravidanza era nel range considerato fisiologico (320-345 giorni, *Holdstock, 2005*).

Nel Caso 1 e 2 sono stati evidenziati: elevato peso placentare (>6,5 kg) in associazione ad alterazioni placentari macroscopicamente apprezzabili e cordoni ombelicali aumentati di volume e edematosi.

Nel Caso 1 la placenta è stata espulsa insieme al puledro in esito ad un parto molto rapido; aveva una colorazione anomala e un odore putrido, facendo sospettare l'insorgenza di una placentite acuta. Purtroppo il liquido amniotico è andato perduto con la rottura del sacco e quindi non se ne è potuto valutare il grado di limpidezza.

Nel Caso 2 l'alterazione placentare era meno evidente poiché si apprezzavano solo delle lacinie fibrose a livello del corpo, indice forse dell'esito di una placentite in via di cronicizzazione; il liquido amniotico, che in questo caso è stato raccolto, non presentava intorbidimento.

Nel Caso 3 e 4 le placente esaminate non presentavano invece alcuna alterazione macroscopicamente apprezzabile.

Alla nascita tutti e 4 i puledri hanno richiesto assistenza ed intervento terapeutico (somministrazione di 1 flacone di lobelina cloridrato e 2cc di toldimfos e vitamine del gruppo B). Nel Caso 3 è stata anche intrapresa una terapia antibiotica per prevenire eventuali complicazioni.

La temperatura rettale nel Caso 1 e 2 era inferiore a 37°C, rispettivamente 36,5°C nel Caso 1 e 36,9°C nel Caso 2; in entrambi i Casi 3 e 4 la temperatura era invece di 37,9°C.

La glicemia nel Caso 2, 3, 4 è risultata inferiore al valore medio registrato nei puledri sani del Gruppo 1 (70mg/dl), ma solo nel Caso 4 era di 35mg/dl e quindi inferiore anche ai livelli di range rilevati nei puledri sani (40-131mg/dl).

In tutti i puledri i problemi più evidenti sono stati relativi al debole riflesso di suzione, al tempo impiegato nel raggiungere la stazione quadrupedale e all'allattamento.

Nel Caso 2 il latte è stato somministrato con il biberon, nel Caso 3 con sonda naso-gastrica e con il biberon per i successivi 6 giorni; nei Casi 1 e 4, sebbene con ritardo (>3h), i puledri sono riusciti ad allattarsi autonomamente.

Per quanto concerne il trasferimento dell'immunità passiva, tutti i puledri sono riusciti ad assumere un'idonea quantità di colostro.

Superate le prime 24h, i puledri del Caso 1 e 4 hanno pienamente recuperato e quindi non è stato necessario alcun tipo di intervento aggiuntivo se non un monitoraggio costante; il puledro del Caso 2 è andato incontro ad onfalite e pertanto è stata intrapresa una terapia antibiotica di copertura per i successivi 4 giorni; nel puledro del Caso 3 che appariva come il più problematico è stata proseguito l'allattamento manuale e la terapia antibiotica per la prima settimana dopodiché si è avuta la risoluzione di tutti i problemi.

Per quanto riguarda la concentrazione plasmatica di ACTH e cortisolo sono stati riscontrati i valori riportati nella tabella seguente:

ACTH T1 (0-6h)	ACTH T2 (24h)	ACTH T3 (48h)	CORT T1 (0-6h)	CORT T2 (24h)	CORT T3 (48h)
85,1	8,1	10,0	15,9	5,8	2,3
166,0	14,5	69,2	8,3	3,2	5,6
216,0	40,6	81,4	10,3	4,6	6,7
543,0	8,5	32,5	7,8	3,6	2,9

Tab. 4: concentrazioni plasmatiche di ACTH (pg/ml) e Cortisolo (mcg/dl) nelle prime 48h di vita dei puledri appartenenti al Gruppo 2.

Sui valori numerici riportati nella tabella 4 sono stati calcolati per ogni T (T1; T2; T3) i valori medi e la mediana che sono risultati rispettivamente:

ACTH:

- media: 252,5pg/ml +/- 201,0pg/ml a T1; 17,9pg/ml +/- 15,4pg/ml a T2; 48,3pg/ml +/- 32,9pg/ml a T3;
- mediana: 191,0pg/ml a T1; 11,5pg/ml a T2; 50,9pg/ml a T3;

Cortisolo:

- media: 10,6mcg/dl +/- 3,7mcg/dl a T1; 10,3mcg/dl +/- 1,2mcg/dl a T2; 4,4mcg/dl +/- 2,1mcg/dl a T3;
- mediana: 9,3mcg/dl al T1; 4,1mcg/dl al T2; 4,3mcg/dl al T3

9.3. Gruppo 3 (BORDER-LINE)

In questo gruppo sono rientrati 10 puledri il cui APGAR è stato valutato tra 7-8; gli altri parametri clinici e di laboratorio non permettevano altresì di includerli né nel gruppo di sani (Gruppo 1) né nel gruppo dei patologici (Gruppo 2). La loro condizione clinica è stata pertanto ritenuta come riconducibile ad una *lieve* sindrome asfittica perinatale, considerando che tale sindrome può manifestarsi anche ad una certa distanza dal parto e quindi il punteggio APGAR può non essere significativo ai fini della sua valutazione (Vaala., 1994; Knottenbelt, Holdstock, Madigan, 2004).

Anche in questo gruppo i problemi maggiormente riscontrati sono stati relativi al raggiungimento della stazione quadrupedale e all'allattamento ritardato rispetto ai tempi fisiologici; probabilmente questi fattori in associazione ad un tasso glicemico mediamente più basso rispetto ai puledri sani (valore medio di 52 mg/dl, con un range compreso tra un valore minimo di 34mg/dl ed un valore massimo di 74 mg/dl), hanno esacerbato la condizione di debolezza generale riportata nella cartella clinica della maggior

parte di questi puledri. In alcuni casi sono stati riportati anche dati anamnestici della fattrice (premature distacco placentare, scarse condizioni ponderali, alterazioni macroscopiche placentari, eccessiva lunghezza del cordone ombelicale...) che hanno permesso di ipotizzare un minore afflusso di sangue ed ossigeno attraverso l'unità utero-placentare, sebbene di lieve entità.

Per quanto riguarda la concentrazione plasmatica di ACTH e cortisolo sono stati riscontrati i valori riportati nella tabella seguente:

ACTH T1 (0-6h)	ACTH T2 (24h)	ACTH T3 (48h)	CORT T1 (0-6h)	CORT T2 (24h)	CORT T3 (48h)
927,0	19,7	56,2	9,2	1,7	1,2
559,0	17,3	78,8	12,7	4,5	3,4
223,0	72,8	77,8	9,4	5,3	3,5
182,0	21,6	24,7	19,5	5,5	6,8
679,0	38,8	24,4	8,6	4,9	2,6
324,0	16,1	23,5	9,6	3,2	4,3
301,0	18,2	36,2	11,5	3,9	3,4
216,0	25,8	61,7	13,8	7,8	4,7
1032,0	24,6	31,7	6,0	3,1	2,2
65,9	6,3	22,6	17,1	4,3	4,8

Tab. 5: Concentrazioni plasmatiche di ACTH (pg/ml) e cortisolo (mcg/dl) nelle prime 48h di vita dei puledri appartenenti al Gruppo 3 (Border-line).

Sui valori numerici riportati nella tabella 5 sono stati calcolati per ogni T (T1; T2; T3) i valori medi, il range e la mediana che sono risultati rispettivamente:

ACTH:

- media: 450,9pg/ml +/- 332,4pg/ml a T1; 26,1pg/ml +/- 18,4pg/ml al T2; 43,8pg/ml +/- 22,8pg/ml a T3;
- range: valore minimo 65,9pg/ml e valore massimo 1032pg/ml a T1; valore minimo 6,3pg/ml e valore massimo 72,8pg/ml a T2; valore minimo 22,6pg/ml e valore massimo 78,8pg/ml a T3;
- mediana: 312,5pg/ml a T1; 20,7pg/ml a T2; 34,0pg/ml a T3.

Cortisolo:

- media: 11,7mcg/dl +/- 4,1mcg/dl a T1; 4,4mcg/dl +/-1,7mcg/dl a T2; 3,7mcg/dl +/-1,6mcg/dl a T3;
- range: valore minimo 6,0mcg/dl e valore massimo 19,5 a T1; valore minimo 1,7mcg/dl e valore massimo 7,8mcg/dl a T2; valore minimo 1,2mcg/dl e valore massimo 6,8mcg/dl a T3;
- mediana: 10,6mcg/dl a T1; 4,4mcg/dl a T2; 3,5mcg/dl a T3.

Il calcolo della media, del range e della mediana svolto sulle concentrazioni plasmatiche di ACTH e Cortisolo a T1, T2, T3 sul Gruppo *patologico* (Gruppo 2 e 3; n=14) ha portato ai seguenti risultati:

ACTH:

- media: 394,2pg/ml +/- 307,3pg/ml a T1; 23,8pg/ml +/- 17,4pg/ml a T2; 45,1pg/ml +/- 24,8pg/ml a T3;
- range: valore minimo 65,9pg/ml e valore massimo 1032pg/ml a T1; valore minimo 6,3pg/ml e valore massimo 72,8pg/ml a T2; valore minimo 10pg/ml e valore massimo 81,4pg/ml.

Cortisolo:

- medie: 11,4mcg/dl +/- 3,9mcg/dl a T1; 4,4mcg/dl +/-1,5mcg/dl a T2; 3,9mcg/dl +/-1,7mcg/dl a T3;
- range: valore minimo 6,0mcg/dl e valore massimo 19,5 a T1; valore minimo 1,7mcg/dl e valore massimo 7,8mcg/dl a T2; valore minimo 1,2mcg/dl e valore massimo 6,8mcg/dl a T3;
- mediana: 10,0mcg/dl a T1; 4,4mcg/dl a T2; 3,5mcg/dl a T3.

Il risultato dello studio statistico di regressione lineare eseguito sul Gruppo patologico (Gruppo 2 e 3) è stato il seguente: a T1 una dipendenza lineare

statisticamente significativa di tipo negativo tra la concentrazione di ACTH e cortisolo ma non una dipendenza statisticamente significativa a T2 e T3:

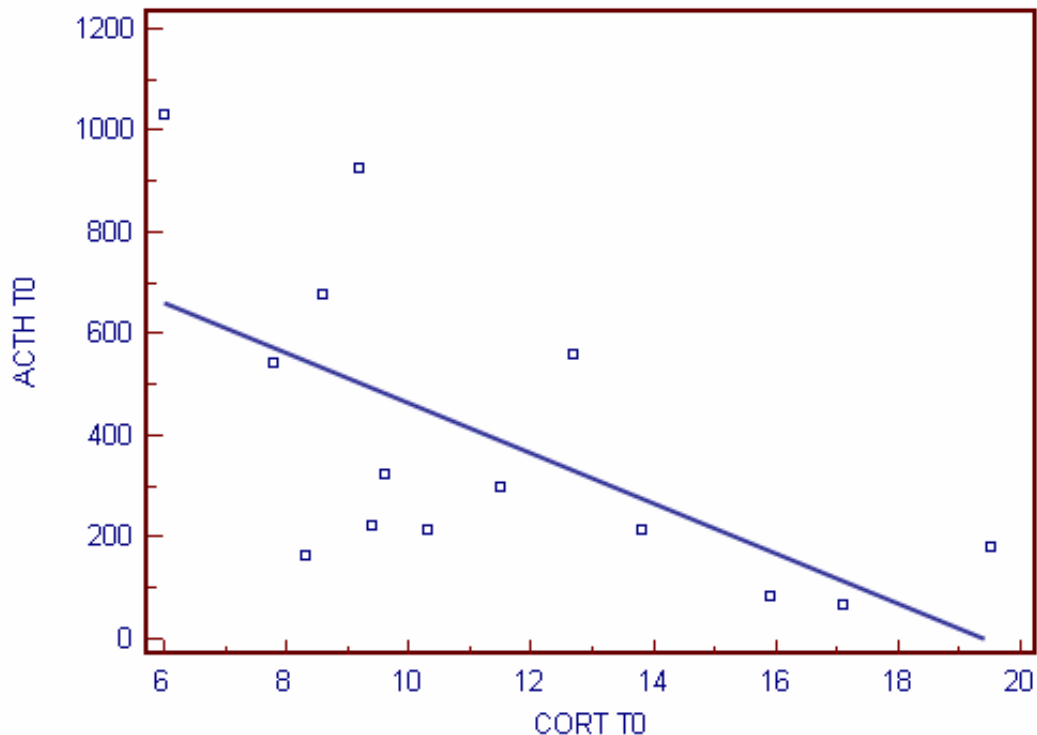


Grafico 4: Regressione a T1: n=14; P=0,017.

Dallo studio statistico svolto applicando il t-test di Student per confrontare le differenze tra la concentrazione di ACTH e cortisolo a T1, a T2 e a T3, tra il Gruppo 1 (sani) ed il Gruppo patologico è emerso il seguente risultato: esiste una differenza statisticamente significativa nella concentrazione plasmatica di ACTH a T3 tra Gruppo 1 e Gruppo patologico ($P=0,0035$); esiste una differenza statisticamente significativa nella concentrazione di cortisolo a T2 e a T3 fra Gruppo 1 e Gruppo patologico ($P=0,0007$ a T2; $P=0,0040$ a T3).

10.DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nella nostra indagine, i risultati ottenuti sul numero totale di puledri (Gruppo 1, Gruppo 2, Gruppo 3) hanno permesso di osservare che alla nascita c'è sempre una sovrastimolazione del surrene, confermando il ruolo chiave dell'asse ipofisi-surrenale nel promuovere l'adattamento alla vita extra-uterina; infatti le concentrazioni plasmatiche di ACTH e cortisolo alla nascita, a prescindere dalle condizioni cliniche, risultano in tutti i casi sensibilmente più elevate rispetto a quelle del cavallo adulto.

Per quanto riguarda il Gruppo 1 (sani), l'andamento nel tempo della concentrazione plasmatica di entrambi gli ormoni nei primi due giorni di vita si è dimostrato simile a quello riportato in letteratura (*Silver e collaboratori, 1984*) con concentrazioni decrescenti sia di ACTH che di cortisolo da T1 a T3. Probabilmente nei soggetti appartenenti a questo gruppo, dopo un'iniziale sovrastimolazione surrenale legata al parto, si va incontro ad una stabilizzazione dell'attività ipofisaria e corticosurrenalica con concentrazioni di ACTH e cortisolo che decrescono intorno ad un valore basale medio di 26,9pg/ml per l'ACTH e di 2,7mcg/dl per il cortisolo (a T3, 48h), confermando la stretta interdipendenza funzionale nel loro meccanismo di secrezione (feedback negativo).

I risultati statistici dell'analisi di regressione mostrano che nel Gruppo 1 solo a 48h(T3) si stabilisce una dipendenza lineare tra il tasso plasmatico di ACTH e di cortisolo; ciò suggerisce che, a prescindere dall'evidente variabilità individuale, è necessario che il puledro si adatti in modo adeguato alla vita extra-uterina perché il suo asse endocrino acquisisca una funzionalità completa e sincrona e questo processo può richiedere diverse ore/giorni; inoltre dal momento che la dipendenza è di tipo positivo (a concentrazioni crescenti di ACTH corrispondono concentrazioni crescenti di cortisolo) la

stimolazione indotta dall'ACTH determinerebbe un'effettiva ed efficace risposta della corticale del surrene.

Al contrario il risultato della regressione lineare sul Gruppo patologico evidenzia una dipendenza tra le concentrazioni dei due ormoni di tipo negativo e solo a 0-6h(T1); la dipendenza di tipo negativo potrebbe implicare che in seguito alla stimolazione indotta dall'ACTH non si abbia una risposta altrettanto adeguata della corticale del surrene e quindi un parallelo incremento della cortisolemia.

Questo risultato è in linea con quello riportato da *Silver e collaboratori (1984)* secondo cui l'insufficiente cortisolemia riscontrata nei puledri dismaturi non sarebbe legata alla carenza di ACTH ipofisario ma all'immaturità e quindi insufficiente risposta del surrene. Tuttavia contrariamente a quanto riportato da questi autori, nel nostro studio a T1 non è emersa una differenza statisticamente significativa tra la cortisolemia dei puledri considerati sani rispetto a quelli patologici e quindi potenzialmente dismaturi. Nella nostra indagine sono sì emersi alcuni valori di cortisolemia che potrebbero essere compatibili con quelli riportati come propri dei puledri dismaturi, ma, poiché il nostro primo prelievo ha coperto temporalmente lo spazio di 0-6h, ed in questo lasso di tempo la cortisolemia risulta secondo la letteratura in merito molto variabile (da 7-8 mcg/dl, alla nascita, a 12-14mcg/dl dopo 1h, a 5-6mcg/dl a ca. 6h; *Silver et al. 1984; Knottenbelt, Holdstock, Madigan, 2004*) i nostri valori limite potrebbero in realtà corrispondere ad una delle fasi succitate, pertanto non possono essere considerati come quelli effettivi in un determinato momento. Inoltre solo in alcuni casi, nei puledri che abbiamo considerato patologici (Gruppo 2 e Gruppo 3), i bassi livelli di cortisolemia a T1 sono risultati paralleli ad una concentrazione di ACTH molto più elevata rispetto alla media, come dovrebbe avvenire nei puledri dismaturi secondo gli studi di *Silver e collaboratori (1984 e 1991)*. Ciò potrebbe dipendere dal

diverso metodo con cui abbiamo condotto la nostra classificazione, che non ha incluso alcuni dei parametri clinici e di laboratorio proposti da *Rossdale e collaboratori (1984)* e utilizzati anche in ricerche successive (*Silver et al. 1991*); nei nostri risultati infatti la concentrazione media di ACTH e cortisolo, nei puledri sani e patologici a T1, non è risultata significativamente diversa. Nel Gruppo 2 e Gruppo 3 l'andamento nel tempo delle concentrazioni plasmatiche di ACTH e cortisolo è risultato decrescente da T1 a T2, ma nuovamente crescente a T3; ciò potrebbe essere spiegato dal fatto che una condizione patologica è di per sé un evento stressogeno e quindi può determinare come risposta organica l'incremento dell'attività dell'asse endocrino ipofisi-surrene con aumento della secrezione di ACTH e di conseguenza del cortisolo; il che sarebbe peraltro confermato dalla differenza statisticamente significativa fra i valori medi in T3 tra i puledri appartenenti al Gruppo 1(sani) e quelli appartenenti al Gruppo patologico, meglio apprezzabile se si osservano i grafici seguenti:

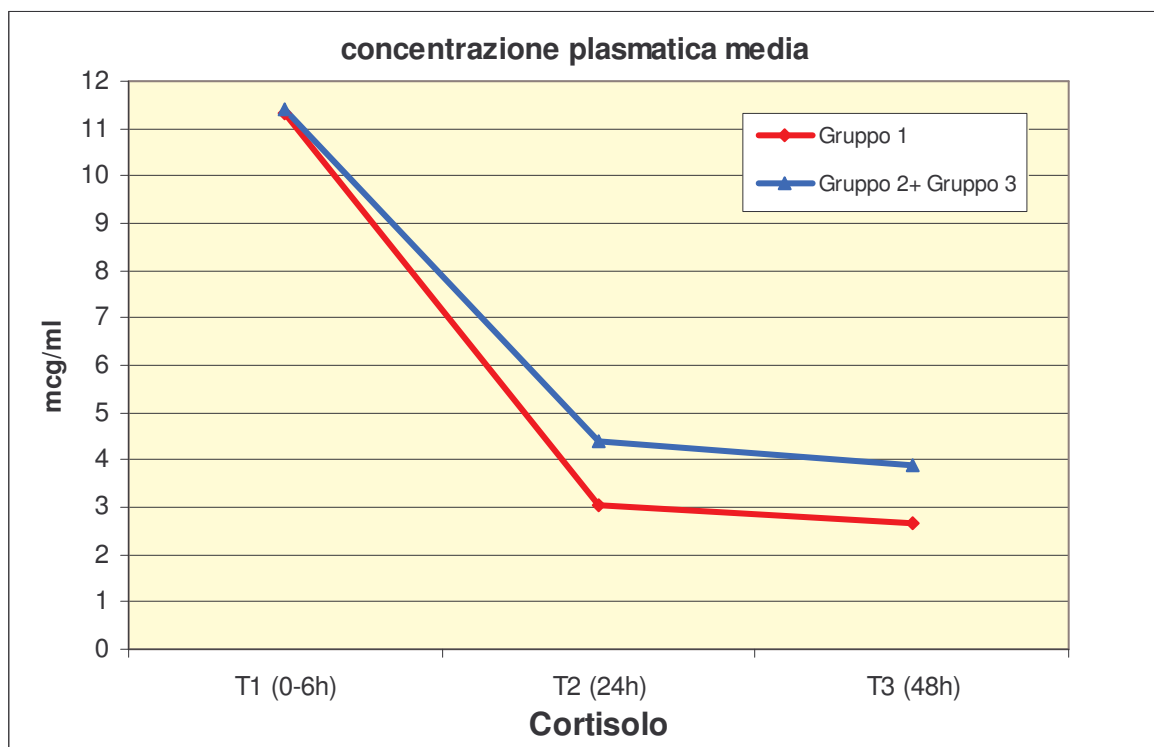


Grafico 5: confronto tra la cortisolemia media del gruppo 1 (sani) e quella del gruppo 2 e 3 (patologici e border-line).

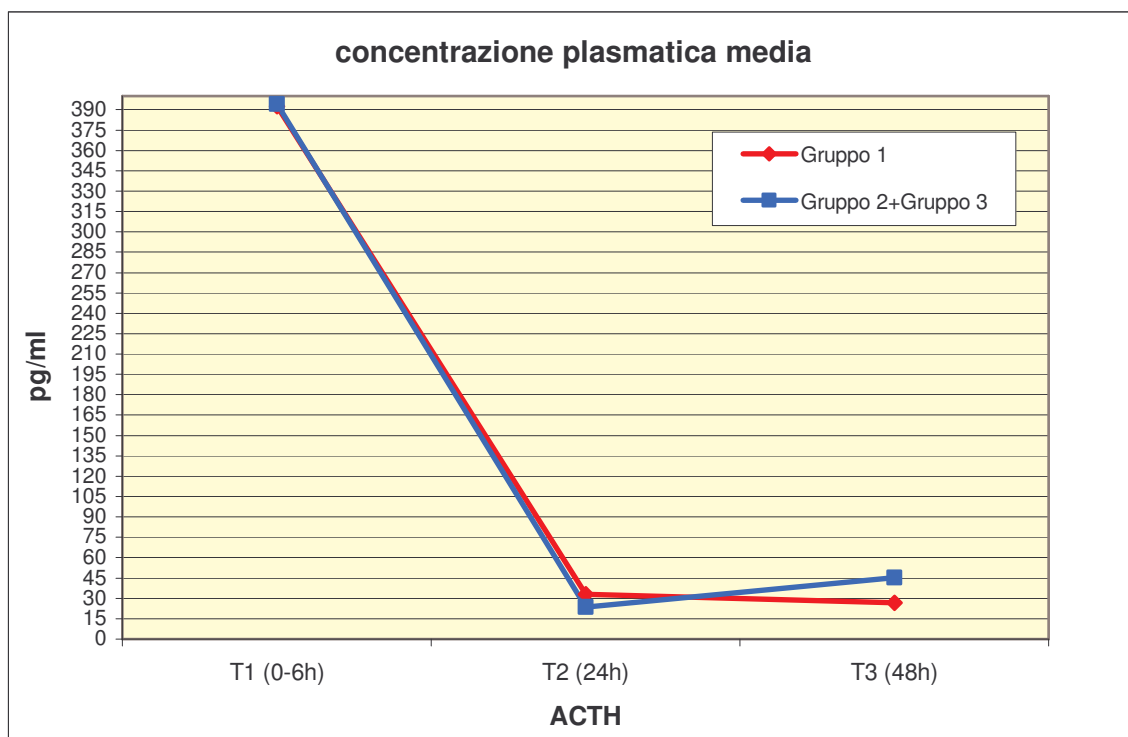


Grafico 6: confronto tra concentrazione plasmatica media del gruppo 1 (sani) e quella del gruppo 2 e 3 (patologici e border-line).

Quindi è possibile che, nei puledri in condizioni cliniche più precarie (lieve e moderata Sindrome Asfittica Perinatale), vi sia un iniziale ritardo nella risposta corticosurrenalica alla stimolazione indotta dall'ACTH; che successivamente la cortisolemia si mantenga a livelli più elevati per incompetenza del meccanismo di regolazione (feedback negativo) che ne dovrebbe provocare l'inibizione (a T2 infatti quando la concentrazione plasmatica di ACTH risulta mediamente della stessa entità nei Gruppi 2 e 3 rispetto al Gruppo 1, la cortisolemia risulta mediamente superiore nel gruppo 2 e 3); e che infine a T3 la cortisolemia, pur subendo una lieve riduzione media in parallelo all'incremento dell'ACTH, si stabilizzi su livelli più elevati in seguito alla persistenza dello stato di stress legato alla condizione clinico-patologica.

È comunque opportuno ribadire che si tratta di considerazioni ipotetiche poiché i risultati ottenuti in questa ricerca sono stati soggetti,

soprattutto a T1, ad una enorme variabilità individuale (vedi range e deviazione standard) legata a diversi fattori: tutti i meccanismi di adattamento alla vita extra-uterina che coinvolgono primariamente l'asse endocrino ipofisi-surrenale sono di per sé rapidi e mutevoli, a maggior ragione nella specie equina dove il completamento dei processi maturativi evolvono in un breve lasso di tempo prima del parto e sconfinano probabilmente anche nel periodo perinatale; gli ormoni oggetto della nostra indagine (ACTH e cortisolo) sottostanno ad un complesso meccanismo di regolazione a sua volta dipendente da numerose altre variazioni organiche che intervengono nell'adattamento alla vita; si tratta inoltre di ormoni pulsatili nel cavallo adulto e non si sa come questa componente possa influire sul neonato; infine i puledri sono estremamente sensibili e, anche piccole e brevi stimolazioni per la semplice manipolazione durante l'assistenza nell'immediato post-parto, possono aver costituito un evento stressante in questa fase estremamente delicata e aver contribuito a tale variabilità, nella considerazione che il primo prelievo in alcuni casi è stato eseguito ad una certa distanza dal parto stesso (0-6h).

Pertanto, per indagini future, è auspicabile che i prelievi nelle prime ore di vita siano molto più serrati per descrivere in modo maggiormente dettagliato l'andamento del profilo endocrino dell'asse ipofisi-surrene (ACTH e cortisolo) e che questi siano possibilmente eseguiti previa applicazione di un'agocannula al fine di ridurre al minimo le nostre manipolazioni.

11.BIBLIOGRAFIA

- Aguggini, G. , Beghelli, V. , Giulio, L. F. et al (1998): Ghiandole Surrenali. *In: Fisiologia degli Animali Domestici con elementi di Etologia, UTET (ed), Torino, 2nd ed. , pp.724-733.*
- Alfaidy, N. , Xiong, Z. G. , Myatt, L. , et al. (2001): Prostaglandin F2 α potentiates cortisol production by stimulating 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1: a novel feedback loop that may contribute to human labour. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86(11): 5585-5592.
- Allen, A. L. , Doige, C. E. , Fretz, P. B. , Townsend, H. C. G. , Card, C. E. (1993): Congenital hypothyroidism dysmaturity and musculo-skeletal lesions in western Canadian foals. *Proceedings of the American Association of Equine Practitioners* 39, 207-208.
- Allen, A. L. , Doige, C. E. , Fretz, P. B. , Townsend, H. C. G. (1994): Hyperplasia of the thyroid gland and cuncurrent musculoskeletal deformities in western Canadian foals: re-examination of a previously described sybdrome. *Canadian Vet. J.* 35, 31-38.
- Antolovich, G. C. , Perry, R. A. , Trahair, J. F. , Silver, M. , Robinson, P. M. (1989): The development of corticotrophs in the fetal sheep pars distalis: the effect of adrenalectomy or cortisol. *Endocrinology* 124, 1333-1339.
- Barnes, R. J. (1997): Perinatal Carbohydrate metabolism and the blood flow of the fetal liver. *Equine Vet. J. Suppl.* 24, 26-31.
- Beech, J. (1987): Tumor of the pituitary gland (pars intermedia). *In: Robinson NE, ed. Current Therapy in Equine Medicine, 2nd ed Philadelphia, PA: WB Saunders; p. 182-185.*
- Berdusco, E. T. M., Yang, K. , Hammond, G. L., Challis, J. R. D. (1995): Corticosteroid-binding globulin (CBG) production by hepatic sites in the ovine fetus: effects of CBG on glucocorticoid negative feedback on pituitary cells in vitro. *J. Endocrinol.* 146, 2571-2578.
- Bernard, W. V. , Reimer, J. M. , Cudd, T. , et al. (1995): Historical factors, clinicopathologic findings, clinical features, and outcome of equine neonates presenting with or developing signs of central nervous system disease. *Proceedings of Annual American Association of Equine Practitioners Convention* 41, 222-224.

- Bernard, W. V. (2003): Jump starting the dummy foal (Neonatal maladjustment syndrome/hypoxic ischemic encephalopathy), *In: 49th Annual Convention of the American Association of Equine practitioners, Lexington KY Internet Publisher: International Veterinary Information Service, Ithaca NY (www.ivis.org), P0603.1103.*
- Boosinger, T. R. , Brendemuehl, J. P. , Bransby, D. L. , et al. (1995): Prolonged gestation, decreased triiodothyronine concentration, and thyroid gland histomorphologic features in newborn foals of mare grazing *Acremonium coenophialum*-infected fescue. *Am. J. Vet. Res.* 56(1), 66-69.
- Bottoms, G. D. , Roesel, O. F. , Rausch, F. D. and Akins, E. L. (1972): Circadian variation in plasma cortisol and corticosterone in pigs and mares. *Am. J. Vet. Res.* 33, 785-790.
- Boujon, C. E. , Bestetti, G. E. , Meier H. P. , et al. (1993): Equine Pituitary adenoma: A functional and morphological study. *J. Comp. Path.* 109, 163-178.
- Bruyette, D. S., Ruehl, W. W., Enriken, T., et al.(1997): Management of canine pituitary –dependent hyperadrenocorticism with 1-deprenyl (Anipryl). *Vet. Clin. North Am. , Small Anim. Pract.* 27, 273.
- Bunn, H. F. , Kitchen, H. (1973): Hemoglobin function in the horse: the role of 2,3-diphosphoglycerate in modifying the oxygen affinity of maternal and fetal blood. *Blood* 42(3), 471-479.
- Camillo, F. , Marmorini, P. , Romagnoli, S. , Cela, M. , Duchamp, G. , Palmer, E. (2000): Clinical studies on daily low dose oxytocin in mares at term. *Equine Vet. J.* 32, 307-310.
- Campitelli, S. , Carenzi, C. , Verga M. (1982): Factors which influence parturition in the mare and development of the foal. *Applied Animal Ethology* 9, 7-14.
- Card, C. E. , Manning, S. T. (2000): Response of newborn foals with thyroid musculoskeletal disease to adrenocorticotrophic hormone (ACTH). *Journal of Reproduction and Fertility Suppl.* 56, 709-715.
- Challis, J. R. G. , Hooper, S. (1989): Birth: outcome of a positive cascade. *In: Baillières Clinical Endocrinology and Metabolism – Perinatal Endocrinology. Bailliere Tindall, London, pp.* 781-793.
- Challis, J. R. G. , Bassett, N. , Berdusco, E. T. M. , Han, V. K. M. , Lü, F. ,Riley, S. C. , Yang, K. (1993): Foetal endocrine maturation. *Equine Vet. J. Suppl.* 14, 35-40.

- Challis, J. R. C. , Cox, D. B. , Sloboda, D. M., (1999): Regulation of corticosteroids in the fetus: control of birth and influence of adult disease. *Semin. Neonatol.* 4, 93-97.
- Challis, J. R. G. , Sloboda, D. , Matthews S. G. , Holloway A. , Alfaidy, N. , Howe, D. , Fraser, M. , Moss, T. J. M. and Newnham, J. (2001): The fetal placental hypothalamic-pituitary-adrenal axis, parturition and post-natal health. *Molecular and Cellular Endocrinology* 185, 135-144.
- Challis, J. R. C. , Sloboda, D. M. , Alfaidy, N. , et al. (2002): Prostaglandins and mechanisms of preterm birth. *Reproduction*, 124(1), 1-17.
- Chavatte P. , Rossdale, P. D. , Tait, A. D. (1995): 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11 β -HSD) in equine placenta. *Am. Assoc. Equine Pract.* 41, 264-265.
- Chavatte, P. , Holtan, D. , Ousey, J. C. , Rossdale, P. D. (1997): Biosynthesis and possible biological roles of progestagens during equine pregnancy and in the newborn foal. *Equine Vet. J. Suppl.* 24, 89-95.
- Chavatte-Palmer, P. , Duchamp, G. , Palmer, E. , ousey, J. C. , Rossdale, P. D. , Lombes, M. (2000): Progesterone, oestrogen, and glucocorticoid receptors in the uterus and mammary glands of mares from mid- to late-gestation. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 56, 661-672.
- Chavatte-Palmer, P. Arnaud, G. , Duvaux-Ponter, C. , Zanazi, C. , Gerard, M. , Ponter, A. , Kindahl, H. , Clement, F. (2002): Use of microdoses of oxytocin in mares to induce parturition. *Theriogenology* 58, 837-840.
- Chen, C. L. , Riley, A. (1981): Serum thyroxine and triiodothyronine concentrations in neonatal foals mature horses. *American Journal of Veterinary Research* 42, 1415.
- Cou  til, L., Paradis, M. R. and Knoll, J. (1996): Plasma adrenocorticotropin concentration in healthy horses and horse with clinical signs of hyperadrenocorticism. *J. Vet. Intern. Med.* 10, 1-6.
- Crone, R. K. , Davies, P. , Liggins, G. C. , Reid, L (1983): The effect of hypophysectomy, thyroidectomy and postoperative infusion of cortisol or adrenocorticotrophin on the structure of the ovine fetal lung. *Journal of Developmental Physiology.* 5, 281-288.
- Cross, D. L. , Redmond, L. M. , Strickland, J. R. (1995): Equine fescue toxicosis: signs and solutions. *American Association of Equine Practitioner.*

- Cudd, T. A. , LeBlanc, M. , Silver, M. , Norman, W. , Madison, J. , Keller-Wood, M. , Wood, C. E. (1995): Ontogeny and ultradian rhythms of adrenocorticotropin and cortisol in the late gestation fetal horse. *J. Endocrinol.* 144, 271-283.
- Dybdal, N.O., Hargreaves, K. M., Madigan, J. E., et al. (1994): Diagnostic testing for pituitary pars intermedia dysfunction in horses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 204, 627.
- Dybdal, N. (1997): Pituitary pars intermedia dysfunction (Equine Cushing's-like Disease) *In: Current Therapy in Equine Medicine, edited by N. Dybdal. Vol 4. Philadelphia, PA, W. B. Saunders Co., p. 499.*
- Egarter, C. H. , Husslein, P. (1992): Biochemistry of myometrial contractility. In: Elder, M. G. , (ed.), Baillières Clinical Obstetrics and Gynaecology – Prostaglandins. *Baillière Tindall, London, pp. 755-769.*
- Fenger, C. K. (1998): Disease of foals. *In: Reed, S. M. , Warwick, M. B. (eds): Equine Internal Medicine. Philadelphia, W. B. Saunders Compant, pp. 939-943.*
- Fishel, R. S. ,Eisenberg, S. , Shai, S. Y. , Redden, R. A. , Bernstein, K. E. , Berk, B. C. (1995): Glucocorticoids induce angiotensin-converting enzyme expression in vascular smooth muscle. *Hypertension* 25, 343-349.
- Fleeger, J. L. , Harms, P. G. , Dunn, E. L. , Atkins, D. T. (1979): Levels of deoxycorticosterone and 21-hydroxy-5 α -pregnane-3,20-dione in the peripheral circulation of the prepartum and post-partum mare. *Biol. Reprod.* 21, 433-437.
- Forhead, A. J. , Fowden, A. L. (1998): Developmental changes in the hypotensive response to angiotensin II type 1 receptor antagonism in fetal sheep near term. *Journal of Physiology* 506, 138P (Abstract).
- Forhead, A. J. , Broughton Pipkin, F. , Fowden, A. L. (1998a): The effect of cortisol on the renin-angiotensin system in fetal sheep during late gestation. *Journal of Physiology* 507, 51-52P (Abstract).
- Forhead, A. J. , Broughton Pipkin, F. , Taylor, P. M. , Baker, K. , Balouzet, V. , Giussani, D. A. , Fowden, A. L. (2000): Developmental changes in blood pressure and rennin-angiotensin system in pony fetuses during the second half of gestation. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 56, 693-703.
- Forhead, A. J. , Broughton Pipkin, F. , Taylor, P. M. , Baker, K. , Balouzet, V. , Giussani, D. A. , Fowden, A. L. (2000): Developmental changes in blood pressure and the renin-angiotensin system in Pony fetuses during the second half of gestation. *Journal of Reproduction and Fertility Suppl.* 56, 693-703.

- Fowden, A. L. , Silver, M. (1984): Studies on equine prematurity 3: Insulin secretion in the foal during the perinatal period. *Equine Vet. J. , 16(4), 286-291.*
- Fowden, A. L., Mundy, L. ,Ousey, J. C., McGladdery, A. G. , Silver, M. (1991): Tissue glycogen and glucose-6-phosphatase levels in fetal and newborn foals. *J. Reprod. Fertil. Suppl. 44, 537-542.*
- Fowden, A. L. , Mijovic, J. , Ousey, J. C. Et al. (1992): The development of gluconeogenic enzymes in the liver and kidney of fetal and newborn foals. *Journal of Developmental Physiology 18(3), 137-142.*
- Fowden, A. L. , Mijovic, J. , Silver, M. (1993): the effects of cortisol on hepatic and renal gluconeogenic enzyme activities in the sheep fetus during late gestation. *Journal of Endocrinology 137, 213-222.*
- Fowden, A. L. , Ralph, M. M. , Silver, M. (1994): Nutritional regulation of uteroplacental prostaglandin production and metabolism in pregnant ewes and mares during late gestation. *Exp. Clin. Endocrinol. 102, 212-221.*
- Fowden, A. L. (1995) : Endocrine regulation of fetal growth. *Reprod. Fertil. Dev. 7, 49-61.*
- Fowden, A. L. , Apatu, R. S. K. , Silver, M. (1995): The glucogenic capacity of the fetal pig: developmental regulation by cortisol. *Experimental Physiology 80, 457-467.*
- Fowden, A. L. , Li, J. , Forhead, A. J. (1998): Glucocorticoids and the preparation for life after birth: are there long-term consequences of the life insurance?. *Proceedings of the Nutrition Society. 57, 113-122.*
- Ginther, O. J. (1992): Reproductive Biology of the mare: Basic and applied aspects. *Cross Plains, W. I. , Equiservices. pp. 419-456.*
- Haluska, G. J. , Lowe, J. E. , Curie, W. B. (1987): Electromyographic properties of myometrium correlated with the endocrinology of the pre-partum and post-partum periods and parturition in pony mares. *J. Reprod. Fertil. Suppl. 35, 553-564.*
- Haluska, G. J. , Currie, W. B. (1988): Variation in plasma concentrations of oestradiol-17 β and their relationship to those of progesterone, 13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin F-2 α and oxytocin across pregnancy and at parturition in pony mares. *J. Reprod. Fertil. 84, 635-646.*
- Hamon, M. , Clarke, S. W. , Houghton, E. , Fowden, A. L. , Silver, M. , Rossdale, P. D. , Ousey, J. C. , Heap, R. P. (1991): Production of 5 α -dihydroprogesterone during late pregnancy in the mare. *J. Reprod. Fertil. Suppl. 44, 529-535.*

- Han, X. , Fowden, A. L. , Silver, M. , Holdstock, N. , McGladdery, A. J. , Ousey, J. C. , Allen, W. R. , Rossdale, P. D. , Challis, J. R. C. (1995): Immunohistochemical localization of steroidogenic enzyme and phenyl ethanolamine N-metyl-transferase (PNMT) in the adrenal gland of the fetal and newborn foal. *Equine Vet. J.* 27, 140-146.
- Han, X. , Rossdale, P. D. , Ousey, J. C. , Holdstock, N. B. , Allen, W. R. , Silver, M., Fowden, A. , McGladdery, A. J. , Labrie, F. , Belanger, A. , Ensor, C. M. , Tai, H-H, Challis, J. R. G. (1995a): Localization of 15-hydroxy prostaglandin dehydrogenase (PGDH) and steroidogenic enzymes in the equine placenta. *Equine Vet. J.* 27, 334-339.
- Hintz, H. F. , Hintz, R. L. , Lein, D. H. et al. (1979): Length of gestation periods in thoroughbred mares. *J. Equine Med. Surg.* 3, 289-292.
- Hoffmann, B. , Gentz, F. , Failing, K. (1996): Investigations into the course of progesterone-, oestrogen- and eCG- concentrations during normal and impaired pregnancy in the mare. *Reprod. Dom. Anim.* 31, 717-723.
- Hoffsis, G. F. , Murdick, P. W., Tharp. V. L. And Ault, K. (1970): Plasma concentrations of cortisol and corticosterone in the normal horse. *Am. J. Vet. Res.* 31, 1379-1387, 1970.
- Holdstock, N. B. (1995): Electrolyte and water homeostasis in the perinatal foal. *PhD Thesis, University of Cambridge.*
- Guy D. Lester, BVMS, PHD (2005): Maturity of the neonatal foal. *Vet. Clin. Equine Practice* 21, 331-355.
- Houghton, E. , Holtan D., Grainger L., et al. (1991): Plasma progestagen concentrations in the normal and dysmature newborn foal. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 44, 609-617.
- Holtan, D. W. , Houghton, E. , Silver, M. , Fowden, A. L. , Ousey, J. C. , Rossdale, P. D. (1991): Plasma progestagens in the mare, fetus and newborn foal. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 44, 517-528.
- Holtan, D. W. , Squires, E. L. , Lapin, D. R. , Ginther, O. J. (1979): Effect of ovariectomy on pregnancy in mares. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 27, 457-463.
- <http://www.bioinfovet.unimi.it/cavallo/imunol.html>
- Ingbar, D. H. , Duvick, S. , Savick, S. K. , Schellhase, D. E. , Detterding, R. , Jamieson, J. D. , Shannon, J. M. (1997): Developmental change of fetal rat lung Na⁺-K⁺-ATPase after maternal treatment with dexamethasone. *American Journal of Physiology.* 271, L665-L672.

- Irvine, C. H. G. , Evans, M. J. (1975): Post natal changes in total and free thyroxine and triiodothyronine in foal serum. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 23, 709-715.
- Irvine C. H. G, Alexander, S. ,L. (1987): Measurement of free cortisol and the capacity and association constant of cortisol binding proteins in plasma of foals and adult horses. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 35, 19-24.
- Irvine, C. H. G. , Alexander, S. L. (1994): Factors affecting the circadian rhythm in plasma cortisol concentration in the horse. *Domest. Anim. Endocrinol.* 11, 227-238.
- Jeffcott, L. B. , Whitwell, K. E. (1973): Twinning as a cause of foetal and neonatal loss in the thoroughbred mare. *J. Comp. Pathol.* 83(1), 91-106.
- James, V. H. T., Horner, M. W., Moss, M. S., and Rippon, A. E. (1970): Adrenocortical function in the horse. *J. Endocrinol.* 48, 319-335.
- Kajantie E. , Dunkel L. , Turpeinen, U. , et al. (2003): Placental 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase-2 and fetal cortisol/cortisone shuttle in small preterm infants. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88(1), 493-500.
- Kitterman, J. A. , Liggins, G. C. , Campos, G. A. , Clements, T. A. , Forster, C. , Lee, C. H. , Creasy, R. K. (1981): Prepartum maturation of the lung in the fetal sheep: relation to cortisol. *Journal of Applied Physiology.* 51, 384-390.
- Klonisch, T. , Hombach-Klonisch, S. (2000): Review: Relaxin expression at the fetomaternal interface. *Reprod. Dom. Anim.* 35, 149-152.
- Knottenbelt, C. D. , Holdstock, N. , Madigan, J. E. (2004): Perinatal review. In: *Equine Neonatology – Medicine and Surgery, Saunders (ed) pp. 1-9.*
- Koterba, A. M. , Brewer, B. D. , Tarplee, F. A. (1984): Clinical and clinicopathological characteristics of the septicemic neonatal foal: Review of 38 cases. *Equine Vet. J.* 16, 376-383.
- Koterba, A. M. (1990): Prematurity, section one: Identification, assessment and treatment. In: *Koterba, A. M. , Drummond, W. H. , Kosh, P. C. (eds): Equine Clinical Neonatology. Philadelphia, Lea and Febiger, pp. 295-316.*
- Koterba, A. M. (1991): Disorders of the neonatal foal. In: *Beech, J. (ed) Equine respiratory disorders. Lea & Febiger, Philadelphia, ch. 22, pp 415-421.*
- Koterba, A. M. (1993): Definitions of equine perinatal disorders: problems and solutions. *Equine Vet. Educ.* 5(5), 271-273.
- Kumar, M. S. A., Liao, T. F. and Chen, C. L. (1976): Diurnal variation in serum cortisol in ponies. *J. Anim. Sci.*, 42, 1360.

- Larsson, M. , Edqvist, L. E. , Ekman, L. and Persson, S. (1979): Plasma cortisol in the horse, diurnal rhythm and effects of exogenous ACTH. *Acta Vet. Scan.* 20, 16-24.
- Leadon, D. F. P. , Jeffcott, L. B. , Rossdale, P. D. (1986): Behaviour and viability of the premature neonatal foal after induced parturition. *American Journal of Veterinary Research* 47, 1870-1874.
- LeBlanc, M. M. (2004): Ascending placentitis in the mare: what we learned from an experimental model. *10° Congresso Nazionale Multisala SIVE*.
- Li, J. , Saunders, J. C. , Gilmour, R. S. , Fowden, A. L. (1996b): Cortisol switches on expression of the liver specific leader exon of the growth hormone receptor (GHR) gene in ovine fetal liver near term. *Journal of Endocrinology Suppl.* 151, P33.
- Liggins, G. C. , Kitterman, J. A. (1981): Development of the fetal lung. *In: The Fetus and Independent Life. Ciba Fdn Symp. , No, Pitman, London, 1981, pp.* 308-322.
- Liggins, G. C. (1994): The role of cortisol in preparing fetus for birth. *Reprod. Fertil. Dev.* 6, 141-150.
- Love, S. (1993): Equine Cushing's disease. *Br. Vet. J.* 149, 139-153.
- Lovell, J. D. , Stabenfeldt, G. H. , Hughes, J. P. , Evans, J. W. (1975): Endocrine patterns of the mare at term. *J. Reprod. Fertil. Suppl. ,* 23, 449-456.
- Marcato, P. S. (1988): Patologia respiratoria animale. Testo e atlante. *Edagricole, Bologna, pp*13-29, 74-75.
- Martens, R. J. (1982): Pediatrics. *In: Mansmann, R. A. , McAllister, E. S. , Pratt, P. W. (eds): Equine Medicine and Surgery, 3rd Ed. , vol. 1. Santa Barbara, American Veterinary Publications p.* 317.
- Martin, P. A. , Crump, M. H. (2003): The Adrenal Gland. *In: Pineda, M. H. , D. V. M. , Ph. D. , Dooley, M. P (eds): McDonald's Veterinary Endocrinology and Reproduction. 5th ed. , Iowa, ch. 6, pp.* 165-195.
- Mason, J. I. , Hinshelwood, M. M. , Murry, B. A. and Swart, P. (1993): Tissue specific expression of steroid 17 α -hydroxylase, C-17,20-lyase, 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase and aromatase in the fetal horse. *Proceedings of the Society for Gynecological Investigation, Toronto, Abstract No* P350.
- McMillen, I. C. , Antolovich, G. C. , Mercer, J. E. , Perry, A. , Silver, M. (1990): Pro-opiomelanocortin messenger RNA levels are increased in the anterior pituitary of the sheep fetus after adrenalectomy in late gestation. *Neuroendocrinology* 52, 297-302.

- Mendelsohn, F. A. O. , Lloyd, C. J. , Kachel, C. , Funder, J. M. (1982): Induction by glucocorticoids of angiotensin converting enzyme production from bovine endothelial cells in the culture and rat lung in vivo. *Journal of Clinical Investigation* 20, 684-692.
- Nathanielsz, P. W. , Rossdale, P. D., Silver, M. , Comline, R. S. (1975): Studies on fetal, neonatal and maternal cortisol metabolism in the mare. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 23, 625-630.
- Nathanielsz, P. W. , Giussani, D. A. , Mecnas, C. A. , Wu, W. , Winter, J. A. , Garcia-Villar, R. , Baguma-Nibasheka, M. , Honnebier, B. O. M. , McDonald, T. J. (1995): Regulation of switch from myometrial contractures to contractions in late pregnancy: studies in the pregnant sheep and monkey. *Reprod. Fertil. Dev.* 7, 293-300.
- Nathanielsz, P. W. , Berghorn, K. A. , Derks J. B. , et al. (2003): Life before birth: effects of cortisol on future cardiovascular and metabolic function. *Acta Paediatr.* 92(7), 766-772.
- NIH, Consensus Development Conference (1995): Effect of corticosteroid for fetal maturation on perinatal outcomes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology Suppl.* 173, 253-344.
- Nussdorfer, G. G., Mazzocchi, G. and Meneghelli, V. (1978): Cytophysiology of the adrenal zona fasciculata. *Int. Rev. Cytol.* 55, 291-365.
- O'Donnell, L. J. , Sheerin, B. R. , Hendry, J. M. , Thatcher, M. J. , Thatcher, W. W. , LeBlanc, M. M. (2003): 24-hour secretion patterns of plasma oestradiol-17 β in pony mares in late gestation. *Reprod. Dom. Anim.* 38, 233-235.
- Orth, D. N. , Holscher, M. A. , Wilson, M. G. , Nicholson, W. E. , Plue, R. E. and Mount, C. D. (1982): Equine Cushing's disease: plasma immunoreactive proopiomelanocortin peptide and cortisol levels basally and in response to diagnostic tests. *Endocrinol.* 110, 1430-1441.
- Orth, D. N. and Nicholson, W. E. (1982): Bioactive and immunoreactive adrenocorticotropin in normal equine pituitary and pituitary tumors of horses with Cushing's disease. *Endocrinol.* 11, 559-563.
- Ousey, J. C. , Rossdale, P. D. , Dudan, F. E. and Fowden, A. L. (1998): The effects of intrafetal ACTH administration on the outcome of pregnancy in the mare. *Reprod. Fertil. Dev.* 10, 359-367.

- Ousey, J. C. , Freestone, N. , Fowden, A. L. , Mason, W. T. , Rossdale, P. D. (2000a): The effects of oxytocin and progestagens on myometrial contractility in vitro during equine medicine. *J. Fertil. Suppl.* 56, 681-689.
- Ousey, J. C. , Rossdale, P. D. , Palmer, L. , Grainger, L. , Houghton, E. (2000b): Effects of maternally administered Depot ACTH1-24 on fetal maturation and the timing of parturition in the mare. *Equine Vet. J.* 32, 489-496.
- Ousey, J. C. , Forhead, A. J. , Rossdale, P. D. , Grainger, L. , Houghton, E. , Fowden, A. L. (2003): The ontogeny of uteroplacental progestagen production in pregnant mares during the second half of gestation. *Reproduction* 69, 540-548.
- Ousey, J. C. (2004): Peripartal endocrinology in the mare and foetus. *Reprod. Dom. Anim.* 39, 222-231.
- Paradis, M. R. , (1987): Lecithin/sphingomyelin ratios and phosphatidylglycerol in term and premature equine amniotic fluid. *Proceedings of the American College of Veterinary Internal Medicine, 5th Annual Meeting*, pp. 789-792.
- Pelagalli, G. V. , Botte, V. (1999): Apparato endocrino. In: *Anatomia Veterinaria sistematica e comparata, edi-ermes, 3rd ed. , Milano*, pp. 352-356.
- Phasen, R. L. , Allen, W. R. , (1979): The role of the fetal gonads and placenta in steroid production, maintenance of pregnancy and parturition in the mare. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* ,27, 499-509.
- Pashen, R. L. , Sheldrick, E. L. , Allen, W. R. , Flint, A. P . F. (1982): Dehydroepiandrosterone synthesis by fetal foal and its importance as an oestrogen precursor. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 32, 389-397.
- Raeside, J. L. , Renaud, R. L . , Christie, H. L. (1997): Postnatal decline in gonadal secretion of dehydroepiandrosterone and 3 β -hydroxyJ. *Reprod. Fertil. Suppl.* 23,469-475.
- Raimbach, S. J. , Thomas, A. L. (1990): Renin and angiotensin-enzyme concentrations in the fetal and neonatal guinea-pig. *Journal of Physiology* 423, 441-451.
- Riggs, M. W. (1987): Evaluation of foals for immune deficiency disorders. *The Veterinary Clinics of North America: Equine Practice.* 3(3), 515-528.
- Robinson, P. M. , Comline, F. S. , Fowden, A. L. , Silver, M. , (1983): Adrenal cortex of fetal lamb: changes after hypophysectomy and effects of synacthen on cytoarchitecture and secretory activity. *Quart. J. Exp. Physiol.* 68, 15-27.

- Ropiha, R. T. , Matthews, R. G. , Butterfield, R. M. et al. (1969): The duration of pregnancy in thoroughbred mares. *Vet. Rec.* 84, 552-555.
- Rossdale, P. D. (1967): Clinical studies on the newborn thoroughbred foal. 1: Perinatal behaviour. *British Veterinary Journal* 123, 470-474.
- Rossdale, P. D. , Short, R. V. , (1967): The time of foaling of thoroughbred. *J. Reprod. Fertil.* 13(2), 341-343.
- Rossdale, P. D. (1972): Modern concepts of neonatal disease in foals. *Equine Vet. J.* 4, 117.
- Rossdale, P. D. , Phasen, R. L. , Jeffcott, L. B. (1979): The use of synthetic prostaglandin analogue (fluprostenol) to induce foaling. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 27, 521-529.
- Rossdale, P. D. , Ousey, J. C., Silver, M., Fowden, A. L. (1984): Studies on equine prematurity 6: Guidelines for assessment of foal maturity. *Equine Vet. J.* 16, 300-302.
- Rossdale, P. D. , Ousey, J. C. , Cottrill, C. M. , et al. (1991): Effects of placental pathology on maternal plasma progestagen and mammary secretion calcium concentrations and on neonatal adrenocortical function in the horse. *Journal of Reproduction and Fertility Suppl.* 44, 579-590.
- Rossdale, P. D. (1993): Clinical view of disturbances in equine foetal maturation. *Equine Vet. J. Suppl.* 14, 3-7.
- Sack, J. , Beaudry, M. , DeLamater, P. V. , Oh, W. , Fisher, D. A. (1976): Umbilical cord cutting triggers hypertriiodothyroninemia and non shivering thermogenesis in the newborn lamb. *Pediatr. Res.* 10, 169-175.
- Santschi, E. M. , LeBlanc, M. M. , Weston, P. G. (1991): Progestagen, oestrone sulphate and cortisol concentrations in pregnant mares during medical and surgical disease. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* , 44, 627-634.
- Sato, K., Miyaki, M. , Sugiyama, K. et al. (1973): An analytical study of the the duration of gestation in horses. *Jap. J. Zoo Tech. Sci.* 44, 375-379.
- Schellenberg, J. C. , Liggins, G. C. , Kitterman, J. A. , Lee, C. H. (1987): Elastin and collagen in the fetal sheep lung II: Relationship to mechanical properties of the lung. *Pediatric Research.* 22, 339-343.
- Schutzer, W. E. , Kerby, J. L. , Holtan, D. W. (1996): Differential effect of Trilostane on the progestin milieu in the pregnant mare. *J. Reprod. Fertil.* 107, 241-248.

- Schutzer, W. E. , Holtan, D. W. (1996): Steroid transformations in pregnant mares: metabolism of exogenous progestins and unusual metabolic activity in vivo and in vitro. *Steroids*, 61(2), 94-99.
- Sevinga M. , Barkema, H. W. , Stryhn, H. et al. (2004): Retained placenta in Friesian mares: incidence and potential risk factors with special emphasis on gestational length. *Theriogenology*, 61(5), 851-859.
- Seal, U. S. and Doe, R. P. (1965): Vertebrate distribution of corticosteroid-binding globulin and some endocrine effects on concentration. *Steroids* 5, 827.
- Shaftoe S. (1990): Peripartum endocrine adaptation. In: Koterba, A. M. ,Drummond, W. H. , Kosch, P. C. (eds): *Equine clinical Neonatology*. WB Saunders, Philadelphia, ch. 4, pp.40-54.
- Shideler, R. K. (1993): The prefoaling period. In: McKinnon, A. O. , Voss, J. L. (eds): *Equine Reproduction* . Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 960-963.
- Silver, M. , Ousey, J. C. , Dudan, F. E. , Fowden, A. L. , Knox, J. , Cash, R. , Rossdale, P. D. (1984): Studies on equine prematurity 2. Post-natal adrenocortical activity in relation to plasma ACTH and catecholamine levels in term and premature foals. *Equine Vet. J.* 16, 275-286.
- Silver, M. , Edwards, A. V. (1987): The development of sympatho-adrenal medulla in fetus and neonate. In: Parvez, H. Parvez, S. (eds), *Biogenic Amines in Development* Elsevier, North Holland. pp 147-211.
- Silver, M. , Fowden, A. L. (1988): Induction of labour in domestic animals: endocrine changes and neonatal viability. In: Künzel, W. , Jensen, A. (eds), *The Endocrine Control of the fetus*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 401-411.
- Silver, M. (1990): Prenatal maturation, the timing of birth and how it may be regulated in domestic animals. *Exp. Physiol.* 75, 285-307.
- Silver, M. , Fowden, A. L. , Knox, J. , Ousey, J. C. , Cash, R. , Rossdale, P. D. (1991): Relationship between circulating tri-iodothyronine and cortisol in the perinatal period in the foal. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 44, 619-626.
- Silver, M. (1992): Parturition: spontaneous and preterm labour and its consequences for the neonate. *Anim. Reprod. Sci.* 28, 441-449.
- Silver, M., Fowden, A. L. (1994): Prepartum adrenocortical maturation in the fetal foal: responses to ACTH₁₋₂₄. *J. Endocrinol.* 142, 417-425.

- Silver, M., Fowden, A. L. (1995): Comparative development of the pituitary adrenal axis in the fetal foal and lamb. *Reprod. Dom. Anim.* 30, 170-177.
- Sist, M. D. , Williams, J. F. , Geary, A. M. (1987): Pregnancy diagnosis in the mare by immunoassay of estrone sulfate in serum and milk. *J. Equine Vet. Sci.* 7, 20-23.
- Sonea, J. (1985): Respiratory Distress Syndrome in neonatal foals. *Compendium of Continuing Education for Practising Veterinarians* 7, 412-419.
- Stawicki R. J. , Reubel H. , Hansen, P. J. , Sheerin, B. R. , O'Donnell, L. J. , Lester, G. D. , Paccamonti, D. L. , LeBlanc, M. M. (2002): Endocrinological findings in an experimental model of ascending placentitis in the mare. *Theriogenology* 58, 849-852.
- Stewart, D. R. , Kindahl, H. , Stabenfeldt, G. H. , Hughes, J. P. (1984): Concentrations of 15-keto-13,14-dihydroprostaglandin F2 α in the mares during spontaneous and oxytocin induced parturition. *Equine Vet. J.* 16, 270-274.
- Thompson, J. C., Ellison, R. , Gillett, R. , Badcoe, L. (1995): Problems in the diagnosis of pituitary adenoma (Cushing's syndrome) in horses. *New Zealand Vet. J.* , 43, 79-82).
- Thorburn, G. D. , (1993): A speculative review of parturition in the mare. *Equine Vet. J. Suppl.* 14, 41-49.
- Trahair, J. F. , Perry, R. A. , Silver, M. , Robinson, P. M. (1987b): Studies on the maturation of the small intestine of the fetal sheep. I. The effects of bilateral adrenalectomy. *Quarterly Journal of Experimental Physiology* 72, 61-69.
- Trahair, J. F. , Sangild, P. (1997): Systemic and luminal influence on the perinatal development of the gut. *Equine Vet. J. Suppl.* 24, 40-50.
- Vaala, W. E. (1994): Perinatology: Common foal disorders. In: Higgins, A. (ed): *Baillière Tindall Equine Manual, London, Baillière Tindall Limited.*
- Vaala, W. E. (2003): Monitoring and Treatment Strategies for the Late Pregnant Mare.
- Van Niekerk, C. H. , Morgenthal, J. C. (1982): Fetal loss and the effect of stress on plasma progestagen levels in pregnant thoroughbred mares. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 32, 453-457.
- Van der Kolk , J. H. , Kalsbeek, H. C., Wensing, T. and Breukink, H. J. (1993b): Equine hyperadrenocorticism – a report of 40 cases (1990-1993). *Proceedings of the 3rd Congress of the World Equine Veterinary Association.* P.17.
- Van der Kolk, J. H. , Nachreiner, R. F. , Schott, H. C. , Refsal, K. R. , Zanella, A. J. (2001): Salivary and plasma concentration of cortisol in normal horses and horses with Cushing's disease. *Equine vet. J.*, 33, 211-213.

- Vivrette, S. L. , Kindahl, H. , Munro, C. J. , Roser, J. F. , Stabenfeldt, G. H. (2000): Oxytocin release and its relationship to dihydro-15-keto-PGF_{2α} and arginine vasopressin release during parturition and to suckling in postpartum mares. *J. Reprod. Fertil.* 119, 347-357.
- Wallace, M. J. , Hooper, S. B. , Harding, R. (1995): Effects of elevated fetal cortisol concentration on the volume, secretion and reabsorption of lung liquid. *American Journal of Physiology.* 270, R33-R40.
- Wallace, M. J. , Hooper, S. B. , Harding, R. (1996): Role of the adrenal glands in the maturation of lung liquid secretory mechanisms in fetal sheep. *Am. J. Physiol.* , 270(1 Pt 2), R33-R40.
- Walzer, K. , Hartwig, B. (1993): Malattie neonatali degli animali. *Edagricole, Bologna*, pp. 8-10, 180-181.
- Warburton, D. , Parton, L. , Buckley, S. , Cosico, L. , Enns, G. , Saluna, T. (1988): Combined effects of corticosteroid, Thyroid hormones and β-agonist on surfactant, pulmonary mechanics and β-receptor binding in fetal lamb lung. *Pediatric Research.* 24, 166-170.
- Webb, P. D. (1980): Development of the adrenal cortex in the fetal sheep: an ultrastructural study. *J. Develop. Physiol.* 2, 161-168.
- Webb, P. D. and Steven, D. H (1981): Development of the adrenal cortex in the fetal foal: an ultrastructural study. *J. Develop. Physiol.* 3, 59-73.
- Webb, P.D., Leadon, D. P., Rosedale, P. D., Jeffcott, L. B. (1984): Study on equine prematurity 5: Histology of the adrenal cortex of the premature newborn foal. *Equine. Vet. J.* 16, 297-299.
- Wilson, M. G. , Nicholson, W. E. , Holscher, M. A. , Sherrell, B. J. , Mount, C. D. and Orth, D. N. (1982): Proopiomelanocortin peptides in normal pituitary, pituitary tumor and plasma of normal and Cushing's horses. *Endocrinol.* 110, 941-954.
- Wood, C. E. , Cudd, T. A . (1997): Development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of the equine fetus: a comparative review. *Equine Vet. J. Suppl.* 24, 74-82.

12. RINGRAZIAMENTI

Ringrazio sentitamente il dott. Marco Maccheroni, Direttore del Laboratorio Dosaggi Endocrinologici dell'Azienda Ospedaliera Pisana per la collaborazione essenziale ai fini dello svolgimento di questa tesi.

Ringrazio il prof. Michele Corazza e la dott. Micaela Sgorbini per il supporto nella stesura di questa ricerca e perché senza di loro la mia avventura nel mondo dei cavalli, in un giorno di pioggia alle Querciole, non sarebbe mai cominciata!

Ringrazio la dottoressa Marmorini, Barbara, Donato, Oris, Angiolina e tutto lo staff della Piaggia che mi hanno insegnato cosa vuol dire il lavoro ma anche quanto può essere divertente e pieno di soddisfazioni! E con loro ringrazio tutti i compagni ed amici delle lunghe notti passate in bianco ricche di emozioni: Angelica, con cui ho mosso i primi passi; Lauretta e le sue mille e una risorse, che era con me il primo giorno piovoso (vedi sopra!) ed è qui, come sempre, anche oggi; Roberta che ha sempre cercato di trasmettermi la sua calma e il saper vivere il qui ed ora delle cose; il carisma di Sara, con cui sono riuscita nell'impresa storica di ritrovare un ago in un pagliaio!! e poi Alessandra, Maria Antonietta e Marta che alla fine anche se non ufficialmente è sempre stata dei nostri!.

Ringrazio il super gruppo di S. Piero che nella clinica ha trascorso giorni e notti e che è stato per me una sorta di famiglia pisana: Vale, Eli, Daniele, Monica e la Wonder Silvia pronta a correre in nostro aiuto ad ogni chiamata!; e ancora Roberto e il prof. Aria con cui ho trascorso giornate ricche di esperienza e di allegria; e ancora ringrazio tutti gli altri professori e studenti mentori e colleghi del mio percorso che, non me ne vogliano se non li ho nominati, per me saranno sempre un ricordo indelebile.

Ringrazio i compagni e gli amici con cui ho iniziato fra le ossa della prima esercitazione di anatomia: la Frà, la Giadina, l'Ele e Giovanni che, sebbene in

parte persi di vista nei meandri della facoltà, sono sempre rimasti nel mio cuore; un grazie particolare alla Clà, alla Bà e a Marco che hanno vissuto con me l'inizio, la convivenza e anche lo sprint finale fra le gioie, le sofferenze e i mille dubbi che insieme abbiamo affrontato e superato.

Ringrazio tutta la mia la mia famiglia vicina e lontana: mamma, babbo e il mio fratellone Alessandro perché mi hanno insegnato cosa vuol dire essere liberi pur essendo indissolubilmente legati.

Ringrazio le mie due “sorelle”, Denia e Clorinda con cui ho sempre condiviso tutto e che non hanno bisogno di parole per capire cosa mi passa per la testa perché lo sanno e basta!

Ringrazio l'Ele, Nicco (e in questo frangente anche la sua e-mail!), la Lucy, la Madda, Pietro e tutti gli amici riscoperti da grande ma non per questo meno importanti.

...E che dire di Nicco, compagno nella vita e ancora stabile del mio caos interiore, il ringraziamento più grande va a te per ogni giorno condiviso insieme compreso questo, uno dei più belli della mia vita e che ti dedico con tutto il cuore...